

Плотников Евгений Владимирович

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ В
СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ
МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ**

02.00.02 — аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск — 2012

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: доктор химических наук, доцент
Короткова Елена Ивановна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ
ОППОНЕНТЫ: Будников Герман Константинович
доктор химических наук, профессор,
член-корр. РАЕН,
Казанский государственный университет,
профессор кафедры аналитической химии

Мамонтова Инесса Петровна,
кандидат химических наук, доцент,
Сибирский государственный медицинский
университет (г. Томск), доцент кафедры
биохимии и молекулярной биологии

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: ФГБОУ ВПО Кубанский государственный
университет, (г. Краснодар)

Защита диссертации состоится «26» сентября 2012 г. в 16.30 на заседании
диссертационного совета Д 212.269.04 при Национальном исследовательском
Томском политехническом университете по адресу: 634050, г. Томск, пр.
Ленина, 30.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке
Национального исследовательского Томского политехнического университета
по адресу: г. Томск, ул.Белинского, 53

Автореферат разослан: « » августа 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
канд. хим. наук, доцент



Гиндуллина Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Исследование состава и свойств биообъектов является приоритетной задачей аналитической химии. Одним из важных показателей гомеостаза живого организма является антиоксидантная активность биообъектов, препятствующая развитию свободно-радикальных процессов в организме. В свою очередь, избыточное содержание активных форм кислорода вызывает радикально-цепные процессы окисления в клетках организма, вызывая значительные нарушения в их нормальном метаболизме. Дисфункции в регуляции свободно-радикальных процессов являются важным звеном развития многих патологий. В частности, при психических заболеваниях активируются патологические механизмы свободно-радикального окисления и формирование синдрома эндогенной интоксикации. Поэтому очень важной становится проблема контроля состояния антиоксидантной системы организма человека при патологиях различного типа, с целью дальнейшей терапевтической коррекции.

Трудности в создании новых эффективных методов диагностики антиоксидантного статуса организма связаны с недостаточным пониманием механизмов кислородного метаболизма в организме человека. В настоящее время методы определения антиоксидантной активности биологических объектов основаны на различных принципах и модельных реакциях, часто используются искусственные радикалы и антиоксиданты не существующие в живых организмах, нет единой размерности показателя антиоксидантной активности биообъектов, результаты измерений часто несопоставимы друг с другом, что затрудняет их интерпретацию. Поэтому поиск новых подходов к определению активности антиоксидантов в биологических объектах является весьма актуальной задачей.

Цель работы: Разработка вольтамперометрического способа определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека на основе модельной системы электровосстановления кислорода для изучения антиоксидантного статуса организма и препаратов для его коррекции.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

1. Исследовать влияние антиоксидантов сыворотки крови человека на процесс электровосстановления кислорода. Оптимизировать способ пробоподготовки сыворотки крови с учетом особенностей вольтамперометрического метода в анализе биообъектов.
2. Провести оценку суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека вольтамперометрическим методом в норме и при психических патологиях.
3. Провести определение гидроксильных радикалов в сыворотке крови человека в норме и при психических патологиях методом флуориметрии.
4. Исследовать влияние солей лития на процесс электровосстановления кислорода, для выявления соединений, имеющих большой потенциал практического применения в психиатрии.

5. Разработать вольтамперометрическую методику определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека. Провести сравнительные исследования суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови с другими аналитическими методами определения активности антиоксидантов.

Научная новизна.

- Впервые исследованы закономерности суммарного влияния антиоксидантов сыворотки крови человека на процесс электровосстановления кислорода. Выявлено, что взаимодействие антиоксидантов сыворотки крови с продуктами восстановления кислорода проходит преимущественно по ЕС механизму.
- Впервые предложен вольтамперометрический подход для оценки суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека в пересчете на глутатион. Оптимизированы этапы пробоподготовки сыворотки крови человека. Выявлена низкая суммарная активность антиоксидантов в сыворотке крови при патологии и ее положительная динамика в ходе медикаментозной терапии.
- Разработан новый подход к оценке количества гидроксильных радикалов в сыворотке крови методом флуориметрии, используя терефталевую кислоту в качестве «ловушки» радикалов. Установлена обратная зависимость между концентрацией гидроксильных радикалов и суммарной активностью антиоксидантов в сыворотке крови.
- Впервые определена антиоксидантная активность психотропных соединений лития методом вольтамперометрии по отношению к процессу электровосстановления кислорода.
- Показана взаимосвязь результатов определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека между вольтамперометрическим, спектрофотометрическим и иммуноферментным методами анализа.

Практическая значимость.

- Разработана методика определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии на основе процесса электровосстановления кислорода в пересчете на глутатион для оценки и мониторинга антиоксидантного статуса организма в норме и при патологии.
- На основе полученных экспериментальных данных предложено использовать показатель суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови как критерий эффективности лечения психических заболеваний.
- Выявлены наиболее активные соединения на основе солей лития, а так же композиции на их основе для корректировки антиоксидантного статуса организма. Установлено, что наибольшую антиоксидантную активность проявляет аскорбат лития. При оценке совместимости компонентов в смесях антиоксидантов предложена наиболее эффективная композиция из

аскорбата лития и дигидрохверцетина в соотношении 5:1. Даны рекомендации для их дальнейшего использования в психиатрии в качестве психостабилизаторов с антиоксидантными свойствами.

- На основе аскорбата лития разработан и зарегистрирован лечебно-профилактический комплекс «Нормотим» для коррекции аддиктивных состояний.
- На основе разработанной методики создан модифицированный прибор «Антиоксидант» со встроенным программным обеспечением для анализа антиоксидантной активности.

На защиту выносятся:

1. Результаты определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека по отношению к процессу электровосстановления кислорода в норме и при психических патологиях.
2. Результаты определения гидроксильных радикалов в сыворотке крови человека в норме и при психических патологиях методом флуориметрии.
3. Результаты определения антиоксидантной активности соединений лития и композиций на их основе, имеющие фармацевтическое значение, по отношению к процессу электровосстановления кислорода.
4. Методика определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека по отношению к процессу электровосстановления кислорода.
5. Результаты сравнительных определений суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека с использованием метода вольтамперометрии и независимых аналитических методов анализа (спектроскопический и имунноферментный).

Апробация работы. Основные результаты работы представлены в докладах на Второй Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 2008); Научно-практической конференции с международным участием «Охрана психического здоровья в демографической политике страны» (Томск, 2008); XI всероссийской конференции студентов и аспирантов «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2010); симпозиуме «Теория и практика электроаналитической химии» (Томск, 2010); Научно-практической конференции, посвященной 70-летию со дня рождения профессора Ю.А. Карбаинова «Электрохимические методы анализа. Теория и практика» (Томск, 2010); 7th Aegean Analytical Chemistry Days (Lesvos, Greece, 2010); Второй международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2011); VIII всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА 2012» (Уфа-Абзаково, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в журналах ВАК и 13 тезисов в сборниках конференций, получено 5 патентов РФ на изобретение.

Диссертация выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-08-00306-а «Исследование антиоксидантной активности сыворотки крови человека в норме и патологии методом вольтамперометрии» и программы ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы ГК № 14.740.11.1440 «Разработка психотропных соединений, обладающих антиоксидантной и иммуностимулирующей активностью».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы из 142 наименований и приложения. Содержит 140 страниц, 29 таблиц, 27 рисунков.

Во введении раскрыта актуальность темы, определены цели и задачи исследования, сформулированы научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе приведен литературный обзор. Рассмотрены общие вопросы процесса восстановления кислорода в биологических мембранах. Дано обоснование разработки новых психотропных соединений с антиоксидантной активностью для лечения аддиктивных состояний. Во второй главе описаны условия эксперимента, представлены данные об используемом оборудовании и объектах исследования. В третьей главе рассмотрены особенности процесса электровосстановления кислорода в присутствии сыворотки крови человека. Представлены результаты определения концентрации гидроксильных радикалов в сыворотке крови человека в норме и при психических заболеваниях методом флуориметрии. В четвертой главе представлены результаты определения антиоксидантных свойств по отношению к процессу электровосстановления кислорода некоторых соединений лития. В пятой главе описаны метрологические аспекты методики определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека. Показаны результаты сравнительных испытаний вольтамперометрического, спектрофотометрического и иммуноферментного методов определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на вольтамперометрическом анализаторе ТА-2 (ООО «НПП Томьаналит», г. Томск) и вольтамперометрическом анализаторе антиоксидантной активности «Анализатор АОА» (ООО «НПП Полиант» г. Томск, Россия) в комплекте с ПК.

В работе использовали метод катодной вольтамперометрии, в частности процесс электровосстановления кислорода (ЭВ O_2), который повторяет четырехэлектронный механизм восстановления молекулы O_2 до воды в клетках живого организма, и таким образом является оптимальной модельной системой для анализа биобъектов. Для оценки влияния исследуемых объектов рассматривали зависимости предельного тока ЭВ O_2 от концентрации их в объеме раствора и от времени протекания процесса ЭВ O_2 в их присутствии.

Вольтамперограммы исследуемых растворов регистрировали на стационарных электродах с линейной разверткой потенциала. Для измерений

использовали индикаторные электроды ртутно-пленочный (РПЭ) и стеклоуглеродный (СУЭ). В качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода использовали хлорид-серебряные электроды (ХСЭ). Оптические измерения проводили на спектрофотометре СФ-46 в кювете с длиной 1 см. Флуориметрические измерения проводили на флуориметре Spectrofluorophotometer RF-5301pc.

В качестве объектов исследований использовали индивидуальные вещества: аскорбиновая кислота, соли лития (аскорбат, сукцинат, аспартат, никотинат, бензоат), дигидрокверцетин разной степени очистки 90%, 92% и 94% («Флавит», Пушино), а так же образцы сыворотки крови человека в норме и при психических патологиях.

Для оценки активности антиоксидантов (АО) исследованных объектов использовали кинетический критерий, отражающий количество активных кислородных радикалов, прореагировавших с антиоксидантом (или суммарным содержанием антиоксидантов) за минуту времени:

$$K = \frac{C_0}{t} \left(1 - \frac{I}{I_0}\right)$$

где I_0 - ток ЭВ O_2 в отсутствии АО в растворе, мкА; I - ток ЭВ O_2 в присутствии АО в растворе, мкА; C_0 - исходная концентрация O_2 в растворе, мкмоль/л; t - время протекания реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами, мин.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Определение оптимальных условий пробоподготовки сыворотки крови человека для оценки суммарной активности антиоксидантов в сыворотке

Известно, что при изменении скорости и времени центрифугирования меняется состав сыворотки крови. При уменьшении скорости и времени центрифугирования раствор становился неоднородным, что может оказывать влияние на воспроизводимость результатов. При увеличении скорости и времени центрифугирования крови можно потерять ценные компоненты антиоксидантной природы, оказывающие влияние на общий антиоксидантный статус организма. Поэтому первоначально использовали методы планирования эксперимента для оптимизации этапов пробоподготовки сыворотки крови человека путем выбора режимов центрифугирования.

Для получения математической модели процесса использовался полный факторный эксперимент. Варьируемыми факторами служили скорость и время центрифугирования крови. В качестве функции отклика использовали критерий суммарной активности антиоксидантов сыворотки крови.

Получено, что модель адекватно описывает процесс, эффект взаимодействия факторов не значим, все коэффициенты линейной модели значимы и имеют знак плюс, что означает увеличение критериев оптимизации с увеличением значений обоих факторов. Следует отметить, что наибольшее влияние оказывает фактор - время центрифугирования сыворотки крови.

Для нахождения точки оптимума реализован метод крутого восхождения и получена двухфакторная поверхность отклика. На основании полученных

результатов определены оптимальные условия пробоподготовки для определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови: $\omega=2000$ об/мин, $t=10$ мин. Полученные оптимальные условия эксперимента согласуются с общепринятой методикой приготовления сыворотки крови.

Особенности процесса электровосстановления кислорода в присутствии сыворотки крови человека

Известно, что ЭВ O_2 является квазиобратимым процессом и протекает в условиях смешанной кинетики, когда скорость диффузии кислорода в растворе сопоставима со скоростью протекания электрохимической стадии его восстановления. Сыворотка крови является сложным многокомпонентным объектом, с высоким содержанием антиоксидантов различной природы и в разных концентрациях. Поэтому проведено исследование суммарного влияния антиоксидантов сыворотки крови человека на процесс ЭВ O_2 .

При добавлении исследуемых образцов в фоновый раствор при скорости развертки потенциала 20 мВ/с на вольтамперограммах наблюдалось уменьшение величины тока ЭВ O_2 и смещение потенциала (предельного тока) волны в положительную область (рис. 1).

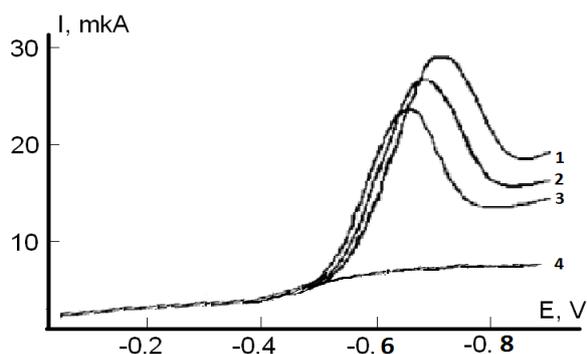
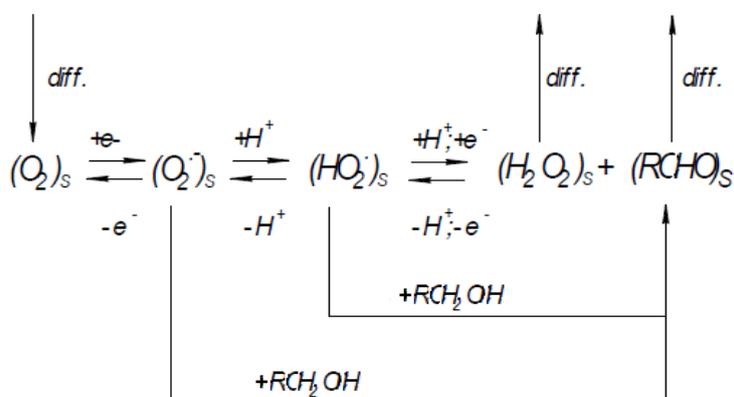


Рис. 1 Вольтамперограмма тока ЭВ O_2 на СУЭ в фосфатном буфере с $pH=6.86$ ($0.025M$ KH_2PO_4 , $0.025M$ Na_2HPO_4), $W=20$ мВ/с в отсутствие (1) и в присутствии 0.1 мл сыворотки крови человека без видимых патологий при t : 5 мин (2) и 10 мин (3). (4) – остаточный ток фоновой электролитной системы в отсутствие O_2 и вещества в растворе.

Такие изменения связаны с влиянием антиоксидантов сыворотки крови на процесс ЭВ O_2 . Общая схема электродного процесса с последующими химическими реакциями взаимодействия антиоксидантов сыворотки крови с активными кислородными радикалами может быть представлена следующим образом:



Показано что для процесса ЭВ O_2 в присутствии сыворотки крови наблюдаются следующие условия:

- зависимость потенциала полувольты тока ЭВ O_2 в присутствии сыворотки крови от $\lg(w^{1/2})$ носит линейный характер (рис. 2), в то время как в отсутствие АО для данного процесса зависимость не линейна.

- при изменении скорости развертки потенциала в 10 раз, потенциал пика смещается на $2.3RT/2nF$ и составляет 30 мВ при $n=1$ (количество электронов, участвующих в лимитирующей стадии электродного процесса).

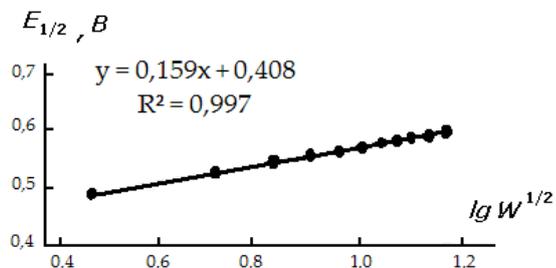


Рис. 2 Зависимость потенциала полувольты ЭВ O_2 от скорости развертки потенциала на СУЭ в фосфатном буфере с $pH=6.86$ ($0.025M$ KH_2PO_4 , $0.025M$ Na_2HPO_4) в присутствии сыворотки крови человека (0.1 мл).

Таким образом, сопоставление полученных и литературных данных позволяет говорить о том, что процесс ЭВ O_2 в присутствии антиоксидантов сыворотки крови осложняется последующими химическими реакциями.

Определение суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека в норме и при психических заболеваниях

В качестве объекта исследования использовали сыворотку крови пациентов с диагнозом синдрома алкогольной зависимости 2 степени и пациентов с диагнозом параноидная шизофрения, проходивших стационарное лечение в Томской областной психиатрической больнице. Для оценки суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека в норме и при психических патологиях сняты вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в отсутствие и в присутствии исследуемых объектов. На основании полученных данных строились зависимости относительного уменьшения тока ЭВ O_2 от времени протекания процесса в присутствии исследуемых образцов сыворотки (рис. 3) и рассчитывались значения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови по кинетическому критерию.

В таблице 1 представлены результаты определения суммарной активности антиоксидантов сыворотки крови человека в норме и у пациентов с диагнозом алкоголизм 2 стадии (выборка по 10-ти пациентам, $n=50$). Как видно из таблицы 1, показатель активности антиоксидантов в сыворотке крови человека в норме составляет около 1.00 мкмоль/л*мин.

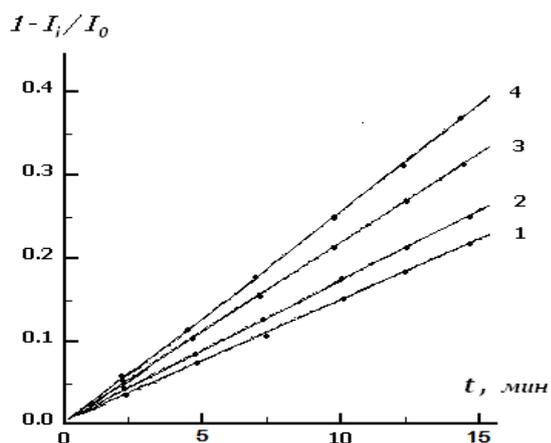


Рис. 3. Зависимость относительного изменения тока ЭВ O_2 от времени протекания процесса в фоновом электролите в присутствии 0.1 мл сыворотки крови: здорового донора (4) и пациента с диагнозом алкоголизм до (1) и после лечения (3), пациента с диагнозом шизофрения (2).

Таблица 1

Значения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови пациентов с диагнозом алкоголизм по отношению к процессу ЭВ O_2 ($p=0.95$, $n=5$)

№	Здоровые доноры	K, мкмоль/л·мин	
		До лечения	После лечения
1	0.85 ± 0.06	0.11 ± 0.04	0.82 ± 0.03
2	1.01 ± 0.07	0.21 ± 0.03	0.81 ± 0.05
3	0.97 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.15 ± 0.04
4	0.91 ± 0.05	0.41 ± 0.03	0.72 ± 0.04
5	1.00 ± 0.09	0.25 ± 0.05	0.63 ± 0.03
6	0.85 ± 0.06	0.32 ± 0.02	0.54 ± 0.06
7	0.98 ± 0.07	0.02 ± 0.01	0.44 ± 0.04
8	0.97 ± 0.04	0.32 ± 0.05	0.65 ± 0.05
9	0.91 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.75 ± 0.04
10	1.03 ± 0.04	0.04 ± 0.02	0.35 ± 0.03

На рис. 4 представлены результаты средних значений показателя суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови пациентов в динамике лечения. Низкий уровень суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови пациентов при поступлении в стационар ($K=0,18 \pm 0,04$ мкмоль/л·мин), по-видимому, объясняется депрессивным состоянием организма после периода длительного употребления алкоголя. Токсические эффекты этанола истощают протекторные системы крови. На завершающем этапе лечения (10 день пребывания в стационаре) наблюдалось значительное повышение данного показателя. Однако, даже на заключительном этапе терапии средний уровень активности антиоксидантов в сыворотке ($K=0,62 \pm 0,04$ мкмоль/л·мин) оставался значительно ниже аналогичного показателя здоровых доноров ($K=0,97 \pm 0,04$ мкмоль/л·мин).

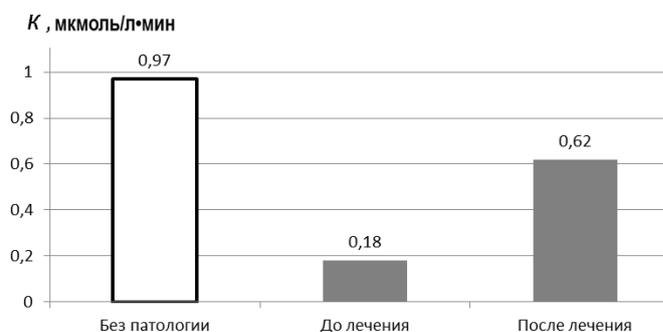


Рис. 4. Средние значения показателя суммарной активности антиоксидантов сыворотки крови пациентов с диагнозом алкоголизм в динамике лечения

Кроме того отмечена взаимосвязь между суммарной активностью антиоксидантов в сыворотке крови пациентов с диагнозом алкоголизм и активностью ферментов аспарагинаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ), которые имеет большую диагностическую ценность в первую очередь при заболеваниях печени (рис. 5).

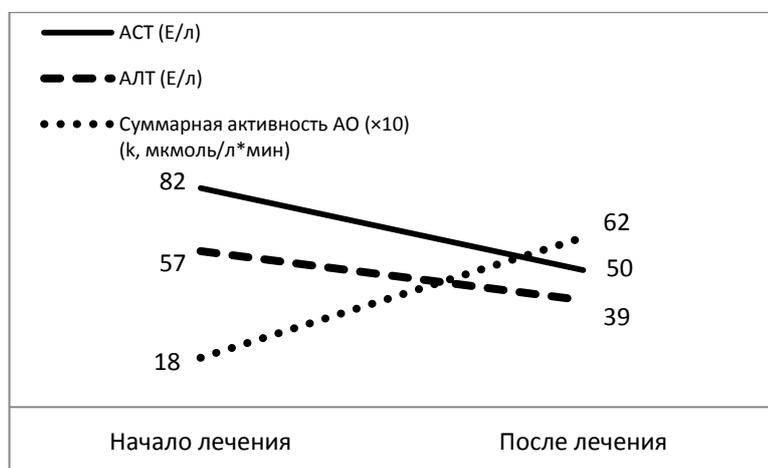


Рис. 5. Взаимосвязь значения показателя суммарной активности антиоксидантов сыворотки крови пациентов с диагнозом алкоголизм в динамике лечения и уровнем активности ферментов АСТ и АЛТ

Пониженный уровень средней суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови соответствовал увеличенному значению активности АСТ и АЛТ. Установлено, что повышение среднего уровня суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови по завершению курса лечения соответствовало снижению АСТ и АЛТ до верхних пределов нормы.

В таблице 2 представлены результаты определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови пациентов с диагнозом параноидная шизофрения (выборка по 5-ти пациентам, n=50).

Таблица 2

Значения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови пациентов с диагнозом параноидная шизофрения по отношению к процессу ЭВ O₂(p=0.95, n=5)

№	K, мкмоль/л·мин	
	до лечения	после лечения
1	0.17 ± 0.04	0.25 ± 0.06
2	0.25 ± 0.06	0.23 ± 0.05
3	0.38 ± 0.05	0.35 ± 0.04
4	0.30 ± 0.04	0.39 ± 0.06
5	0.68 ± 0.07	0.74 ± 0.07

Среднее значение суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови при поступлении в стационар ($K=0,35\pm 0,13$) ниже, чем у здоровых доноров. После 10 дней лечения данный показатель ($K=0,39\pm 0,14$) составляет менее 40 % от аналогичного показателя здоровых доноров.

Таким образом, показано, что при психических патологиях протекторные антиоксидантные системы организма истощаются, а по изменению показателя суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови пациентов можно оценить степень эффективности проведенных лечебных мероприятий.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что введенный показатель суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови является важным лабораторным аналитическим критерием.

Метрологические аспекты методики определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека

На данный момент нет единой регламентированной процедуры оценивания как антиоксидантной активности, так и суммарного количества антиоксидантов в различных объектах: нет государственных стандартных образцов антиоксидантов, нет единой размерности и нормированного показателя антиоксидантной активности, в том числе и биообъектов.

Для выхода из сложившейся ситуации предложено оценивать показатель суммарного количества антиоксидантов в сыворотке крови человека в пересчете на концентрацию глутатиона по градуировочному графику относительного изменения тока ЭВ O_2 от его концентрации в растворе (рис. 6). Выбор глутатиона обусловлен стабильностью его структуры, антиоксидантными свойствами, а также значительным присутствием в сыворотке крови человека (до 4,5 ммоль/л).

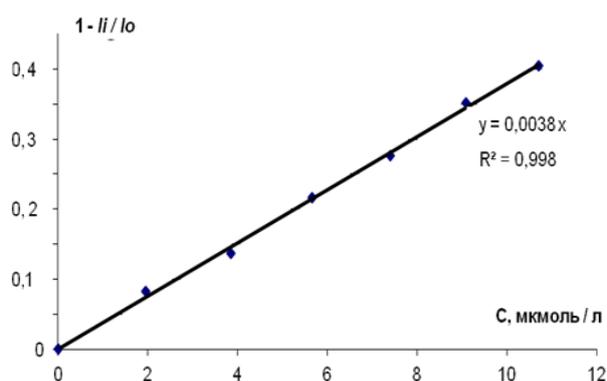


Рис. 6. Зависимость относительного изменения тока ЭВ O_2 от концентрации глутатиона на СУЭ в фосфатном буфере с $pH=6,86$ ($0,025M K_2HPO_4, 0,025M Na_2HPO_4$)

На основании полученных данных выведено уравнение регрессии зависимости относительного изменения тока ЭВ O_2 от молярной концентрации глутатиона в растворе фонового электролита в диапазоне от $1 \cdot 10^{-4}$ до $10 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³: $1 - I_i / I_0 = 0,0038 \times C$

Проведена проверка гипотезы линейности данного градуировочного графика. Оценена адекватность математической модели по критерию Фишера. В представленном диапазоне концентраций модель адекватна.

Для подготовки методики к метрологической аттестации определены метрологические характеристики методики, представленные в таблице 3. Все

процедуры расчетов проводились в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002, действующего на территории РФ.

Таблица 3

Метрологические характеристики методики определения показателя суммарного количества антиоксидантов в сыворотке крови человека по отношению к процессу ЭВ O₂ в пересчете на концентрацию глутатиона (p = 0.95, n=3, l=10)

Молярная концентрация глутатиона, моль/дм ³	Показатели прецизионности (относительные значения)		Показатель точности (границы относительной погрешности при P= 0, 95), ±δ, %
	Стандартное отклонение повторяемости, σ _r , %	Стандартное отклонение внутрилабораторной прецизионности, σ _{R_r} , %	
0,000196	7	11	25
0,00038	6	10	24
0,00074	5	8	20
0,0091	5	8	21
0,0011	4	8	20

По полученным метрологическим показателям для рассматриваемых поддиапазонов концентрации глутатиона принято решение приписать наибольшую погрешность (25%) для всей области рассматриваемых концентраций градуировочной характеристики.

Введенный показатель суммарного количества антиоксидантов в сыворотке крови в пересчете на концентрацию глутатиона решает проблемы метрологической аттестации методики. Однако на практике более удобно использовать ранее введенный кинетический критерий, выраженный в мкмоль/(л·мин). Это взаимозаменяемые параметры.

Сравнительные определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови с использованием разных методов

Несмотря на многообразие методов оценки активности антиоксидантов в сыворотке крови, зачастую сравнивать данные, полученные разными методами, не представляется возможным, поскольку методы основаны на разных модельных системах, имеют разную размерность показателя антиоксидантной активности. Поэтому иногда сравнивать численные значения нецелесообразно, но можно провести корреляцию между результатами, полученными разными методами.

В первом случае в качестве метода сравнения выбран спектрофотометрический метод с неферментативной системой генерации кислородных радикалов. Спектрофотометрическая методика определения суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови основывалась на способности антиоксидантов конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксид-анион радикалы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД•Н) и феназинметасульфата (ФМС). В результате этой реакции НСТ восстанавливается с образованием формазана (синего цвета). В присутствии антиоксидантов процент восстановления НСТ уменьшается.

Результаты сравнительных испытаний определения показателя суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови человека (выборка по 5-ти здоровым донорам, n=50), представлены в таблице 4 и рис. 7.

Таблица 4

Значения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови здоровых доноров, измеренные СФМ и ВА методами (p=0.95, n=5)

№	K, мкмоль/л*мин	
	спектрофотометрический метод	вольтамперометрический метод
1	0.83 ± 0.04	0.85 ± 0.06
2	0.95 ± 0.05	1.01 ± 0.07
3	0.93 ± 0.06	0.97 ± 0.04
4	0.87 ± 0.06	0.91 ± 0.05
5	0.92 ± 0.06	1.00 ± 0.09

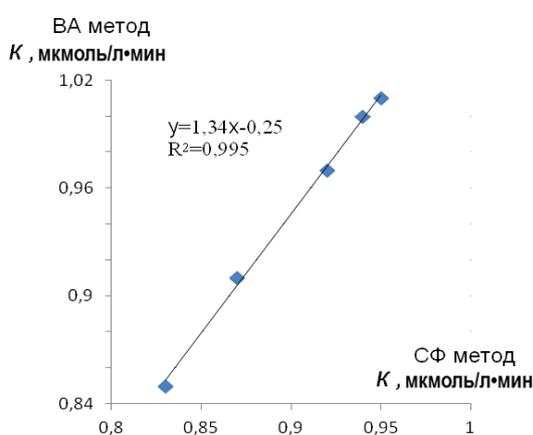


Рис. 7. Зависимость показателей суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови здоровых доноров, полученных спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами

Во втором случае в качестве метода сравнения выбран иммуноферментный метод анализа с использованием тест-системы «ОхуStat». В качестве объекта исследования использована сыворотка крови пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), перенесших аорто–коронарное шунтирование в условиях искусственного кровообращения на базе кардиохирургического отделения НИИ кардиологии СО РАМН г.Томска.

Сравнительное исследование антиоксидантного статуса проводилось на разных этапах: до начала оперативного вмешательства (А), остановки кровообращения (В1), через 6 часов после искусственного кровообращения (В2) и через сутки после операции (С). Результаты сравнительных испытаний определения показателя суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови пациентов (выборка по 3-м пациентам, n=8), представлены в таблице 5 и рис. 8.

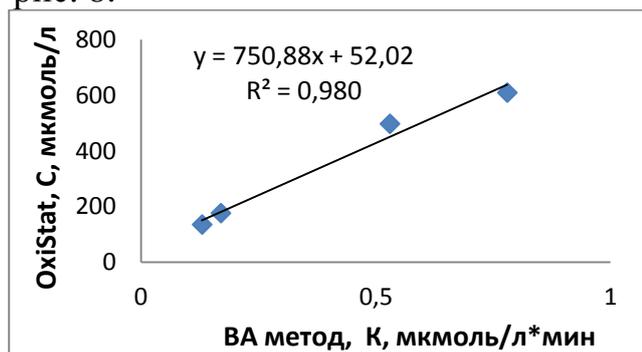


Рис. 8. Зависимость показателей суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови пациента с ИБС на разных этапах операции аорто-коронарного шунтирования, полученных иммуноферментным анализом и вольтамперометрическим методом

Значения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови пациентов с ИБС, измеренные ИФА и ВА методом ($p=0.95$, $n=5$)

№	Код образца	ВА метод К, мкмоль/л*мин	ИФА OxyStat, мкмоль/л
1	A	0.78 ± 0.03	609 ± 8
	B1	0.13 ± 0.06	134 ± 3
	B2	0.17 ± 0.02	176 ± 3
	C	0.53 ± 0.02	497 ± 5
2	A	0.12 ± 0.06	390 ± 4
	B1	0.038 ± 0.004	5 ± 1
	B2	0.042 ± 0.005	84 ± 5
	C	0.31 ± 0.04	480 ± 4
3	A	0.076 ± 0.002	464 ± 8
	B1	0.015 ± 0.005	81 ± 1
	B2	0.045 ± 0.007	118 ± 7
	C	0.082 ± 0.003	518 ± 5

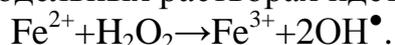
Из данных таблиц 4 и 5 видно, что численного совпадения результатов нет, что и было ожидаемо, поскольку модельные реакции методов различны. Однако можно говорить о корреляции методов (рис. 7 и 8).

Определение гидроксильных радикалов в сыворотке крови человека флуориметрическим методом

ОН[•] радикал является наиболее агрессивным продуктом восстановления кислорода как повреждающий агент в отношении клеток организма. Прямое определение гидроксильных радикалов в разных объектах, включая сыворотку крови человека, практически невозможно, т.к. время жизни ОН[•] радикалов в водной среде около 10^{-9} с.

Предложена флуориметрическая методика оценки количества гидроксильных радикалов в сыворотке крови человека, используя терефталевую кислоту в качестве ловушки гидроксильных радикалов.

Образование ОН[•] в модельных растворах идет по реакции Фентона:



Реакция терефталевой кислоты с гидроксильным радикалом приводит только к одному гидроксилатному продукту, который устойчив и дает хороший сигнал в спектре флуоресценции при длине волны $\lambda=425$ нм (рис.9). Анион терефталевой кислоты не дает подобного сигнала.

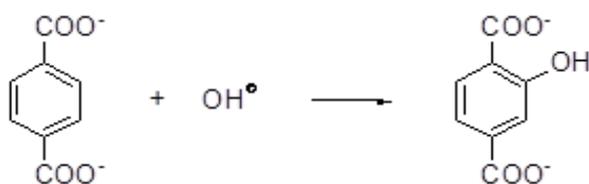


Рис. 9. Схема реакции терефталевой кислоты с гидроксильным радикалом при протекании реакции Фентона в растворе

Для количественного определения OH^\bullet радикалов в сыворотке крови человека получен пик флуоресценции ТА-ОН в идентичной области спектра с длиной волны $\lambda=425$ нм. Полученный сигнал рос с увеличением объема сыворотки крови в растворе (рис.10).

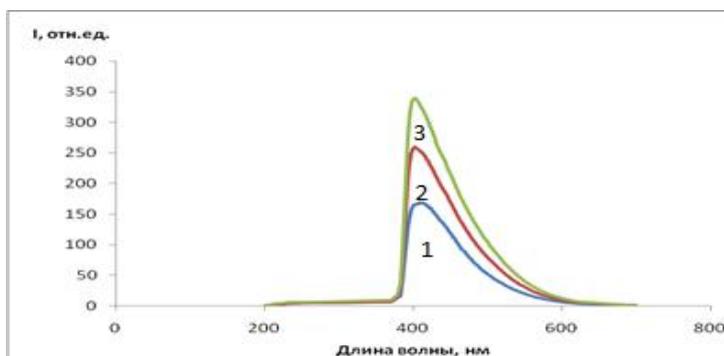


Рис. 10. Спектр флуоресценции ТА-ОН в сыворотке крови пациента с диагнозом алкоголизм при $\lambda=425$ нм: 0,1 мл (1), 0,2 мл (2), 0,3 мл (3).

Таким образом, природные компоненты сыворотки крови человека генерируют OH^\bullet радикалы, концентрацию которых можно определить, используя данную флуориметрическую методику.

В таблице 6 представлены результаты определения количества OH^\bullet радикалов в сыворотке крови здоровых доноров и пациентов с диагнозом алкоголизм 2 степени до и после лечения методом флуориметрии (выборка по 8-ти пациентам, $n=50$).

Таблица 6

Количество OH^\bullet радикалов в сыворотке крови в норме и при патологии методом флуориметрии ($p=0.95$, $n=5$)

Шифр пациента	Концентрация OH^\bullet в сыворотке крови здоровых добровольцев ммоль/л	Концентрация OH^\bullet радикалов в сыворотке крови пациентов до лечения, ммоль/л	Концентрация OH^\bullet радикалов в сыворотке крови пациентов после лечения, ммоль/л
1	0.30 ± 0.02	0.62 ± 0.04	0.31 ± 0.03
2	0.45 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.44 ± 0.02
3	0.39 ± 0.02	0.70 ± 0.02	0.42 ± 0.03
4	0.31 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.38 ± 0.04
5	0.41 ± 0.02	0.68 ± 0.02	0.36 ± 0.02
6	0.29 ± 0.04	0.66 ± 0.03	0.40 ± 0.04
7	0.34 ± 0.04	0.72 ± 0.06	0.37 ± 0.04
8	0.27 ± 0.04	0.73 ± 0.05	0.35 ± 0.03
9	0.50 ± 0.03	0.69 ± 0.04	0.36 ± 0.04
10	0.32 ± 0.04	0.70 ± 0.04	0.41 ± 0.03

Показано, что уровень содержания OH^\bullet радикалов в сыворотке крови при поступлении пациента в стационар больше чем тот же показатель после проведенного курса лечения. Сопоставление результатов исследования выявило обратную зависимость между концентрацией OH^\bullet радикалов и суммарной активностью антиоксидантов в сыворотке крови человека (рис. 11). Максимальное расхождение этих показателей наблюдается после длительного периода злоупотребления алкоголем. На фоне минимальной активности антиоксидантных систем крови наблюдается увеличение количества

ОН• радикалов в крови. Отмечено, что проведенные лечебные мероприятия уменьшили количество ОН• радикалов, при этом наблюдается увеличение суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови.

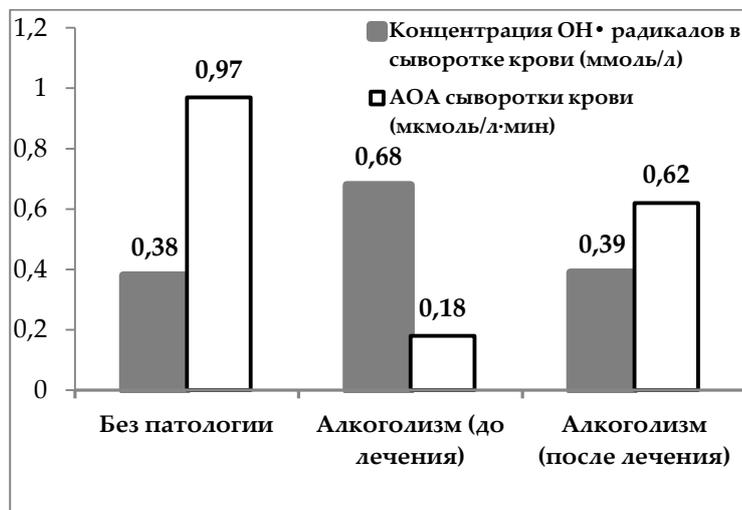


Рис. 11. Зависимость между концентрацией ОН• радикалов и суммарной активностью антиоксидантов в сыворотке крови человека

Таким образом, было выявлено, что уровень ОН• радикалов в сыворотке крови здоровых доноров меньше, чем у пациентов с диагнозом алкоголизм. По-видимому, повышение продукции нативных радикалов наблюдается на фоне истощения антиоксидантных систем крови. Поэтому необходимо применение антиоксидантов на ранних стадиях лечения, что будет способствовать направленной коррекции оксидантного стресса.

Таким образом, полученные данные позволяют рекомендовать разработанный подход по определению гидроксильных радикалов в сыворотке крови методом флуориметрии, используя терефталиевую кислоту в качестве основного реагента, для оперативного контроля за содержанием активных кислородных радикалов в сыворотке крови пациента

Определение антиоксидантной активности соединений лития

В химиотерапии психических патологий широко используются препараты лития. В настоящее время основным психостабилизатором является карбонат лития, не обладающий антиоксидантной активностью, при этом риск развития побочных эффектов существенно ограничивает возможность его использования. Исходя из предыдущих исследований, разработана новая концепция – «психотропные антиоксиданты» – соединения, которые должны обладать психостабилизирующим действием и выраженной антиоксидантной активностью.

В работе проведены исследования антиоксидантной активности соединений лития, где в качестве исходных субстанций для анионного компонента выбран ряд органических кислот с изученной биоактивностью (рис. 12). Для оценки совместного эффекта компонентов проведено изучение антиоксидантной активности композиций с добавлением известного природного антиоксиданта дигидрокверцетина (ДГК) в диапазоне соотношений (1:20) - (1:5).

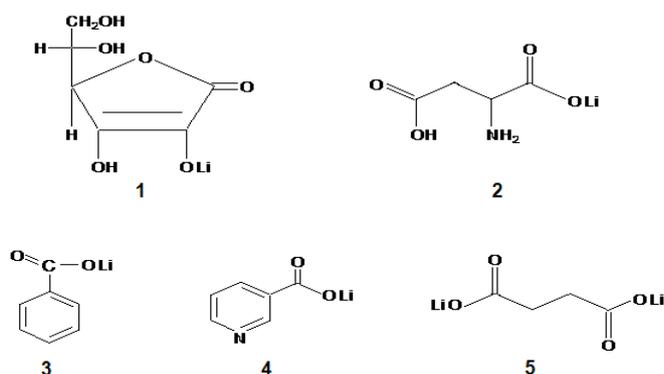


Рис. 12 Структурные формулы соединений лития: аскорбат лития (1), аспартат лития (2), бензоат лития (3), никотинат лития (4), сукцинат лития (5).

В таблице 7 представлены результаты определения антиоксидантной активности соединений лития и композиций на их основе по отношению к процессу ЭВ O_2 , рассчитанные по кинетическому критерию.

Таблица 7. Значения антиоксидантной активности соединений лития по отношению к процессу ЭВ O_2 ($p=0.95$, $n=5$)

Исследуемое вещество	K , мкмоль/л·мин.	St
Аскорбат лития	1.25	0.07
Сукцинат лития	0.51	0.03
Бензоат лития	0,53	0,039
Аспартат лития	0.46	0.03
Никотинат лития	0.23	0.03
Аскорбат лития/ДГК (20:1)	1.24	0.11
Аскорбат лития/ДГК (5:1)	1.31	0.12
Сукцинат лития/ДГК (20:1)	0.59	0.13
Сукцинат лития/ДГК (5:1)	0.63	0.13
Аспартат лития/ДГК (20:1)	0.68	0.09
Аспартат лития/ДГК (5:1)	0.71	0.10
Никотинат лития/ДГК (20:1)	0.44	0.12
Никотинат лития/ДГК (5:1)	0.69	0.15

Повышение антиоксидантной активности наблюдается в ряду: никотинат-аспартат–сукцинат-бензоат-аскорбат лития. Наибольшая относительная антиоксидантная активность выявлена для комбинации дигидрокверцетина с аскорбатом лития (1:5). Кроме того прослежена взаимосвязь между антиоксидантной активностью аскорбата лития по отношению к процессу ЭВ O_2 и его иммуномодулирующими свойствами *invitro*, по влиянию на иммунокомпетентные клетки крови человека. Установлено отсутствие побочного токсического влияния на лимфоциты и наличие стимулирующего действия на фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов крови человека. Эти данные подтверждаются низкой острой токсичностью аскорбата лития (LD_{50} составляет 4840 мг/кг), при этом токсическое действие широко применяемого в медицинской практике карбоната лития более чем в 6 раз выше.

Таким образом, аскорбат лития совмещает положительные свойства антиоксиданта и иммуномодулятора, что делает его весьма перспективным для создания новых эффективных лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы закономерности влияния антиоксидантов сыворотки крови человека на процесс электровосстановления кислорода. Обосновано предположение о *ЕС*-механизме взаимодействия антиоксидантов сыворотки крови с активными формами кислорода.
2. Найдены оптимальные параметры пробоподготовки сыворотки крови методами планирования эксперимента для оценки показателя суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови методом вольтамперометрии путем выбора оптимальных режимов центрифугирования.
3. Проведена оценка суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека в норме и при психических патологиях по отношению к процессу электровосстановления кислорода. Выявлено значительное снижение суммарной активности антиоксидантов при психических патологиях.
4. Разработана методика выполнения измерений показателя суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека в пересчете на концентрацию глутатиона. В соответствии с регламентируемой процедурой аттестации методики выполнения измерений рассчитаны основные метрологические характеристики анализа.
5. Проведены сравнительные определения суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови вольтамперометрическим методом и стандартными методами определения антиоксидантной активности. Установлена взаимосвязь между результатами вольтамперометрического, спектрофотометрического и иммуноферментного метода.
6. Разработан способ оценки концентрации гидроксильных радикалов в сыворотке крови человека методом флуориметрии, используя терефталиевую кислоту в качестве «ловушки» радикалов. Установлено повышение концентрации гидроксильных радикалов в сыворотке крови при алкоголизме. Выявлена обратная зависимость между концентрацией гидроксильных радикалов и суммарной активностью антиоксидантов в сыворотке крови.
7. Проведено определение антиоксидантной активности соединений лития и композиций на их основе методом вольтамперометрии по отношению к процессу электровосстановления кислорода. Выявлено, что среди изученных соединений наибольшую антиоксидантную активность проявляет аскорбат лития. При оценке совместимости компонентов в смесях антиоксидантов (соединений лития с дигидрохверцетином) предложена наиболее эффективная композиция на основе аскорбата лития и дигидрохверцетина в соотношении 5:1 соответственно.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., Karbainov Y.A. Antioxidant and electrochemical properties of calcium and lithium ascorbates // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37(2005), p.1149-1154.
2. Кузнецова Е.О., Липских О.И., Короткова Е.И., Балашов П.П., Плотников Е.В., Н.С.Захария Исследование антиоксидантной активности сыворотки крови больных алкоголизмом методом вольтамперометрии // Охрана психического здоровья в демографической политике страны: тезисы докладов научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию ОГУЗ Томской клинической психиатрической больницы под ред. В.Я. Семке, Т.П. Ветлугиной.-Томск: Изд-во «Иван Федоров», 2008.- с. 181-182.
3. Балашов П.П., Аникина Е.Ю., Плотников Е.В., Потапов А.В., Чучалин В.С. Сравнительное изучение нейротоксического действия солей лития // Сибирский вестник психиатрии и наркологии – 2008.- №4 (51). –с. 84.
4. Плотников В.М., Ветлугина Т.П., Балашов П.П., Плотников Е.В. Изучение гемопротекторного эффекта аскорбата лития при токсическом воздействии этанола // Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии : тезисы докладов Второй Всероссийской конференции с международным участием под ред. В.Я. Семке, Т.П. Ветлугиной.-Томск: Изд-во «Иван Федоров», 2008.- с. 184-185.
5. Липских О.И., Аврамчик О.А., Кузнецова Е.О., Балашов П.П., Плотников Е.В. Антиоксидантная активность психотропных препаратов на основе солей лития // Охрана психического здоровья в демографической политике страны: тезисы докладов научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию ОГУЗ Томской клинической психиатрической больницы под ред. В.Я. Семке, Т.П. Ветлугиной.-Томск: Изд-во «Иван Федоров», 2008.- с. 205-206
6. Плотников Е.В., Короткова Е.И., Дорожко Е.В., Букель М.В., Линерт В. Исследование суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови человека в норме и патологии алкоголизма методом вольтамперометрии // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. №12, 2009, Том 75, с. 14-17.
7. Плотников Е.В., Дорожко Е.В., Букель М.В. Сравнительная оценка антиоксидантной активности крови человека в норме и при алкоголизме методом вольтамперометрии // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XI всероссийской конференции студентов и аспирантов. Т.1; Национальный исследовательский Томский политехнический университет. – Томск: изд-во ТПУ, 2010. – с. 357
8. Короткова Е.И., Плотников Е.В., Дорожко Е.В., Букель М.В. Исследование суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови человека в норме и при патологии методом вольтамперометрии //Теория и практика электроаналитической химии: сборник трудов симпозиума; Томский политехнический университет. - Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010,- с.112
9. Плотников Е.В., Короткова Е.И. Синергетический эффект антиоксидантных свойств дигидрокверцетина и лития аскорбата //Теория и практика электроаналитической химии: сборник трудов симпозиума; Томский политехнический университет. - Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010,- с.126
10. Короткова Е.И., Плотников Е.В., Букель М.В. Вольтамперометрический метод определения суммарной антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения // Электрохимические методы анализа. Теория и практика: материалы научно-практической конференции, посвященной 70-ю со дня рождения проф. Ю.А. Карбаинова – Томск, ТПУ, 3-4 сентября 2010. – Томск: Изд. ТПУ, 2010. – с. 78-89
11. Plotnikov E.V., Korotkova E.I. Antioxidant properties of dihydroquercetin and lithium ascorbates // 7th Aegean Analytical Chemistry Days: book of abstracts; Lesvos, Greece, 2010, p. 254

12. Elena I. Korotkova, Bashkim Misini, Elena V. Dorozhko, Mariya V. Bukkel, Evgeniy V. Plotnikov and Wolfgang Linert Study of OH• Radicals in Human Serum Blood of Healthy Individuals and Those with Pathological Schizophrenia // Int. J. Molecular. Science. 2011, 12, 401-409
13. Плотников Е.В., Короткова Е.И., Плотников В.М., Дорожко Е.В., Букель М.В., Воронова О.А. Применение вольтамперометрии в предклиническом тестировании нового противомикробного препарата // Сборник трудов Второй международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» г. Санкт-Петербург, Россия, 2011, с. 262-264
14. Плотников Е.В., Короткова Е.И., Плотников В.М., Дорожко Е.В., Букель М.В., Воронова О.А. Изучение антиоксидантной активности органических солей лития для создания психотропных антиоксидантов // Сборник трудов Второй международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине».г. Санкт-Петербург, Россия, 2011, с. 168-170
15. Дорожко Е.В., О.А. Воронова, Короткова Е.И., Плотников Е.В., Петрова Е.В. Определение тиоловых соединений в сыворотке крови человека с доклинической стадией заболевания эпилепсией методом вольтамперометрии // Заводская лаборатория. Диагностика материалов, №12, 2011. Том 77.
16. Короткова Е.И., Плотников Е.В., Воронова О.А., Дорожко Е.В. Определение суммарной активности антиоксидантов в сыворотке крови человека в норме и при патологии психотропных заболеваний // Материалы VIII Всероссийской конференции «Электрохимические методы анализа», Уфа-Абзаково, 3-9 июня 2012 г., с. 45.
17. Воронова О.А., Петрова Е.В., Дорожко Е.В., Короткова Е.И., Плотников Е.В. Тиоловые соединения и антиоксидантный статус организма: сравнительная оценка при поведенческих расстройствах // Материалы VIII Всероссийской конференции «Электрохимические методы анализа», Уфа-Абзаково, 3-9 июня 2012 г., с. 78.
18. Плотников Е.В., Короткова Е.И., Воронова О.А., Дорожко Е.В., Вишенкова Д.А. Психотропные антиоксиданты: сравнительное изучение // Материалы VIII Всероссийской конференции «Электрохимические методы анализа», Уфа-Абзаково, 3-9 июня 2012 г., с. 120.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю признательность научному руководителю – д.х.н., проф. Коротковой Елене Ивановне за помощь при подготовке и написании диссертационной работы; а так же д.х.н. проф. Бакибаеву Абдигали Абдимановичу, д.х.н. проф. Колпаковой Нине Александровне, зав. кафедрой психиатрии, наркологии и психотерапии СибГМУ д.м.н., проф. Балашову Петру Прокопьевичу; к.м.н. исполнителю директору ОАО «ФиБр-Мед» Плотникову Владимиру Михайловичу, к.х.н. Вороновой Олесе Александровне и к.х.н. Дорожко Елене Владимировне за проявленный интерес к работе и плодотворное сотрудничество.