

8. *Harrer D.R., Stern B.K., Reilly R.W.* Removal and dissociation of epithelial cells from the Rodent gastrointestinal tract // *Nature*. — 1964. — 202, № 4942. — P. 319—320.
9. *Hegazy E., Lopez del P.V., Schwenk M.* Isolated intestinal mucosa cells of high viability from guinea pig // *Eur. J. Cell Biol.* — 1983. — 30, № 1. — P. 132—136.
10. *Kimmich G.A.* Preparation and characterization of isolated intestinal epithelial cells and their use in studying intestinal transport // *In Methods of Membrane Biology*. — N.Y. — 1975. — P. 61—115.
11. *Lowry O.H., Rosebrough N.F., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. — *J. Biol. Chem.* — 1951. — 193, № 1. — P. 265—275.

Націонал. аграр. ун-т М-ва сільськ.
госп-ва і продовольства України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 30.09.93

УДК 616.153.915-074

М.Ю.Аношина, И.И.Лановенко

Оценка свободнорадикального окисления липидов в эритроцитах и плазме крови

Розроблена модифікація спектрофотометричного методу визначення первинних, вторинних і кінцевих продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) із однієї проби еритроцитів і плазми крові. Визначення продуктів ПОЛ в екстрагованих ліпідах при довжині хвилі 220 нм — E_{220} — показує вміст ізольованих подвійних зв'язків, при довжині хвилі 232 нм — E_{232} — вміст дієнових кон'югатів (ДК) — первинних продуктів ПОЛ; при довжині хвилі 268 нм — E_{286} — вміст триєнових кон'югатів (ТК) — сполук із трьома спряженими подвійними зв'язками; при довжині хвилі 278 нм — E_{278} — вміст оксодієнових кон'югатів (ОДК) — вторинних продуктів ПОЛ; при довжині хвилі 400 нм — E_{400} — вміст сполук типу шифових основ (ШО) — кінцевих продуктів ПОЛ. Відносну кількість молекулярних продуктів ПОЛ розраховували за такими відношеннями: E_{232}/E_{220} — первинних продуктів; E_{278}/E_{220} — вторинних продуктів і E_{400}/E_{220} — кінцевих продуктів ліпопероксидації. За допомогою описаного методу одержано результати дослідження етапів ПОЛ у інтактних щурів лінії Вістар та у щурів з експериментальною формою залізодефіцитної анемії. Метод дозволяє оцінити не тільки зміну інтенсивності реакцій кожного з етапів ПОЛ, але й за відношенням цього показника в еритроцитах і плазмі крові охарактеризувати ступінь вираження обмінних реакцій між ними, а за зміною відношення дієнових, триєнових та оксодієнових кон'югатів визначити напрямок метаболізму ненасичених ліпідів, ступінь окислення жирних кислот і встановити індекс окислення.

Введение

Одним из основных универсальных звеньев в патогенезе различных заболеваний считают нарушения в структуре и функции биомембран, в основе которых лежит изменение полярности белково-липидных комплексов за счет окисления радикалов жирнокислотных компонентов липидов. Имею-

© М.Ю.АНОШИНА, И.И.ЛАНОВЕНКО, 1994

щиеся способы оценки функционального состояния мембран основаны на изучении одного из основных механизмов деструкции — перекисного окисления липидов (ПОЛ). Увеличение доли свободного окисления при патологии приводит к инициации свободнорадикального окисления мембранных липидов, что сопровождается образованием первичных, вторичных и конечных продуктов липопероксидации. Для поддержания определенных физических свойств мембраны (проницаемость, текучесть и др.) важно сохранение постоянного уровня ненасыщенности липидов. Чем больше двойных связей, тем легче они подвергаются перекисидации [6]. Поэтому при изучении роли липопероксидации в патогенезе заболевания, закономерностей протекания перекисного окисления при патологическом состоянии важно знать характеристику всех показателей каждого из продуктов ПОЛ, включая и число двойных связей, так как этот показатель может нести в себе информацию о глубине и мере выраженности патологического процесса, а также возможности его коррекции.

Анализ свободных радикалов липидов крови проводят флуорометрическим, хемилюминесцентным, кинетическим, спектрофотометрическим и другими методами [8, 11]. Чаще всего применяют спектрофотометрический метод определения гидроперекисей — первичных продуктов липопероксидации [4] и малонового диальдегида (МДА) — вторичного продукта ПОЛ [5]. Спектры гидроперекисей ненасыщенных жирных кислот имеют характерный максимум при длине волны 232 нм, обусловленный поглощением диеновых конъюгатов [2, 7]. При определении учитывается только гептановая фаза экстракта, основу которой составляют нейтральные липиды, и не учитываются фосфолипиды (изопропанольная фаза), являющиеся важнейшими субстратами ПОЛ. Из вторичных продуктов определяют МДА — по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), но поскольку кроме МДА ряд низкомолекулярных соединений (сахара, сиаловые кислоты, некоторые аминокислоты) также реагируют с ТБК, то в конечном результате реакции определяют сумму ТБК-активных продуктов. Кроме того, МДА может метаболизироваться, образовывать комплексы с аминокислотами, в связи с чем низкая стационарная концентрация МДА не может служить доказательством того, что не происходит повышенная липопероксидация. Конечные продукты ПОЛ (соединения типа шиффовых оснований) определяют хемилюминесцентным методом.

Многообразие методов определения продуктов ПОЛ, начиная со стадии образования липидных радикалов и кончая метаболически инертными продуктами, разная их чувствительность и информативность, необходимость использования дорогостоящей и сложной аппаратуры, отсутствие единых сопоставимых единиц измерения поставили перед нами задачу разработать такой метод, который бы адекватно отражал динамику всех этапов ПОЛ, позволял одновременно в одном образце определять первичные, вторичные и конечные продукты липопероксидации и не требовал комплекса приборов для измерений.

Методика

Исследования проводили на крысах линии Вистар массой 100—200 г. Животных (20 крыс) в течение 1 мес содержали на железодефицитном рационе. Контролем служили интактные крысы (20 животных). 2—3 мл крови (кровь брали натошак) с гепарином центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин. Эритроциты отмывали дважды 10 мл физиологического рас-

тв
Пл
см
пр
ты
ди
за
но
ки
пр
до
от
пр
пр

ко
ро
стр
(Д
дли
(О
ши
5
авт
лир
пер
тел
дли
ны
сод
ся
нем
тог
дац
фак
кро
коэ
мен
Р
соот
зата

где
и 6
эрит
ля, п

твора. После отмывания их гемолизировали водой в соотношении 1:5. Плазму (0,5/мл) и гемолизат (0,5/мл) эритроцитов экстрагировали 5 мл смеси гептан-изопропанол (1:1 по объему) при встряхивании в закрытых пробирках в течение 15 мин. После центрифугирования липидные экстракты сливали и разбавляли 5 мл смеси гептан-изопропанол (3:7 по объему) для достижения оптимальных значений оптической плотности в обеих фазах экстракта. Для отмывки от нелипидных примесей и разделения гептановой и изопропанольной фаз добавляли 2 мл водного раствора соляной кислоты (рН 2), хорошо перемешивали и после разделения фаз в сухую пробирку отбирали верхнюю гептановую фазу, а к водно-спиртовой фазе добавляли 1 г NaCl для обезвоживания изопропанольного экстракта. После отделения водной фазы верхнюю (изопропанольную) отбирали в сухую пробирку. Оптический контроль с 0,5 мл воды обрабатывали как и опытные пробы. Все процедуры с кровью проводили в ледяной бане.

Измеряли оптическую плотность каждой фазы против соответствующего контроля при длине волны 220 нм — E_{220} — отражает содержание изолированных двойных связей в экстрагированных липидах, являющихся субстратами ПОЛ — при длине волны 232 нм — E_{232} — содержание диеновых (ДК), при длине волны 268 нм — E_{268} — содержание триеновых (ТК), при длине волны 278 нм — E_{278} — содержание оксодиеновых конъюгатов (ОДК) и при длине волны 400 нм — E_{400} — содержание соединений типа шиффовых оснований (ШО).

За основу был взят спектрофотометрический метод Волчегорского из соавт. [3], позволяющий определять в пробах цельной крови содержание изолированных двойных связей в экстрагированных ненасыщенных липидах, первичных (ДК) и вторичных (ОДК) продуктов ПОЛ. Мы ввели дополнительные спектрофотометрические определения при двух длинах волн: при длине волны 268 нм — отражает содержание соединений с тремя сопряженными двойными связями — (ТК) и при длине волны 400 нм — отражает содержание конечных продуктов ПОЛ — соединений типа ШО, являющихся структурной основой липофусцинов (кериоида), представляющих собой неметаболизируемые маркеры дистрофических процессов в клетке. Кроме того, модифицированным методом мы определяем продукты липопероксидации в эритроцитах и плазме крови, что позволяет оценить не только сам факт интенсивности реакций на всех этапах ПОЛ в разных компонентах крови, но по отношению одинаковых показателей в эритроцитах и плазме, коэффициенту распределения, охарактеризовать меру выраженности обменных реакций между клеткой и внеклеточной средой.

Расчет содержания продуктов липопероксидации проводили по формуле, соотнося значения соответствующих экстинций к 1 мл плазмы или гемолизата эритроцитов:

$$\begin{aligned} \text{для гептановой фазы} & \quad \text{—} \quad E/\text{мл} = E_{.4}/0,5 = E_{.8} \\ \text{для изопропанольной фазы} & \quad \text{—} \quad E/\text{мл} = E_{.6}/0,5 = E_{.12}, \end{aligned}$$

где E — оптическая плотность пробы при соответствующей длине волны; 4 и 6 — объемы соответствующей фазы; 0,5 — объем плазмы или гемолизата эритроцитов, взятый для определения. Относительное содержание молекул, ных продуктов ПОЛ рассчитывали по следующим отношениям:

$$\begin{aligned} E_{232}/E_{220} & \quad \text{—} \quad \text{для определения первичных продуктов,} \\ E_{278}/E_{220} & \quad \text{—} \quad \text{для определения вторичных продуктов и} \\ E_{400}/E_{220} & \quad \text{—} \quad \text{для определения конечных продуктов} \\ & \quad \text{липопероксидации [9].} \end{aligned}$$

Результаты и их обсуждение

Как видно из результатов, приведенных в таблице, у интактных животных концентрация ненасыщенных липидов (по содержанию изолированных двойных связей — E220), ДК, ТК, ОДК и ШО больше, чем в изопропанольной фазе экстрактов липидов. Та же тенденция отмечается и для липидных экстрактов плазмы крови, что свидетельствует о лучшей растворимости

Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и изолированных двойных связей в эритроцитах и плазме крови белых крыс линии Вистар с экспериментальной алиментарной железодефицитной анемией (M±m)

Показатель	Интактные животные (контроль)				Животные с железодефицитной анемией			
	Эритроциты		Плазма крови		Эритроциты		Плазма крови	
	Гептановая фаза	Изопропанольная фаза	Гептановая фаза	Изопропанольная фаза	Гептановая фаза	Изопропанольная фаза	Гептановая фаза	Изопропанольная фаза
Абсолютное содержание продуктов ПОЛ, Е/мл:								
двойных связей	0,483± ±0,04	0,803± ±0,03	1,81± ±0,13	5,65± ±0,22	0,301± ±0,02*	3,21± ±0,81*	2,07± ±0,08	9,89± ±0,64*
диеновых конъюгатов	0,253± ±0,03	0,315± ±0,012	0,866± ±0,08	2,06± ±0,11	0,133± ±0,014*	0,914± ±0,079*	0,721± ±0,034	2,57± ±0,03
триеновых конъюгатов	0,078± ±0,005	0,333± ±0,018	0,327± ±0,04	1,38± ±0,17	0,047± ±0,004*	0,639± ±0,063*	0,352± ±0,019	1,48± ±0,06
оксодиеновых конъюгатов	0,082± ±0,006	0,351± ±0,017	0,299± ±0,016	1,53± ±0,19	0,029± ±0,002*	0,459± ±0,047*	0,262± ±0,021	1,41± ±0,10
шифровых соединений	0,010± ±0,002	0,089± ±0,007	0,009± ±0,001	0,034± ±0,007	0,046± ±0,004*	0,279± ±0,039*	0,059± ±0,0008*	0,075± ±0,002*
Относительное содержание продуктов ПОЛ:								
первичных	0,414± ±0,04	0,384± ±0,018	0,448± ±0,038	0,356± ±0,011	0,436± ±0,035	0,259± ±0,026*	0,349± ±0,01*	0,258± ±0,007*
вторичных	0,187± ±0,01	0,390± ±0,018	0,152± ±0,02	0,241± ±0,004	0,105± ±0,013*	0,174± ±0,018*	0,144± ±0,008	0,143± ±0,003*
конечных	0,015± ±0,002	0,124± ±0,007	0,005± ±0,0002	0,005± ±0,0003	0,162± ±0,014*	0,093± ±0,009*	0,029± ±0,001*	0,008± ±0,0007*

* P<0,05 достоверные отличия от результатов контрольной группы.

продуктов ПОЛ в изопропанолe и снижении гидрофобности с ростом ненасыщенности неполярных веществ. Что касается расчета относительного содержания продуктов ПОЛ, то в гептановой фазе липидных экстрактов эритроцитов наблюдается преимущественное содержание первичных продуктов, более чем в два раза меньше содержится вторичных, конечных же продуктов — следы. В изопропанольной фазе — равное содержание первичных и вторичных продуктов липопероксидации и в 2,3 раза меньше конечных продуктов ПОЛ. Для гептановой фазы плазмы крови характерны те же соотношения, что и для эритроцитов, в то время как для изопропанольной

фазы — другие: преимущественное содержание первичных продуктов липопероксидации, следы — конечных продуктов и в 1,4 раза меньше содержится вторичных продуктов ПОЛ. Это связано с отмеченными различиями в распределении продуктов перекисного окисления липидов и ненасыщенных липидов между фазами.

При алиментарной анемии (ЖДА) в гептановой фазе экстракта эритроцитов отмечается уменьшение содержания изолированных двойных связей, ДК, ТК, ОДК и увеличение концентрации ШО (в пересчете на 1 мл гемолизата эритроцитов). Относительное содержание вторичных молекулярных продуктов ПОЛ снижается в 1,8 раза, в то время как относительное содержание конечных молекулярных продуктов липопероксидации увеличивается в 10,8 раза. В изопропанольной фазе на фоне увеличения содержания изолированных двойных связей, ДК, ТК, ОДК и ШО (в пересчете на 1 мл гемолизата эритроцитов, $P < 0,05$), относительное содержание первичных, вторичных и конечных молекулярных продуктов ПОЛ достоверно снижаются. В гептановой фазе липидных экстрактов плазмы крови, основу которой составляют нейтральные липиды, значительно увеличивается относительное содержание конечных молекулярных продуктов липопероксидации, при этом отмечена тенденция к снижению вторичных продуктов и достоверное уменьшение концентрации первичных продуктов ПОЛ. В изопропанольной фазе отмечено значимое накопление ненасыщенных липидов и ШО (в пересчете на 1 мл плазмы крови). Относительное содержание первичных, вторичных и конечных молекулярных продуктов липопероксидации снижается ($P < 0,05$).

Статистически достоверное увеличение коэффициента окисленности (отношение ДК к ОДК) в гептановой и изопропанольной фазах эритроцитов крови: $4,59 \pm 0,21$ (в контроле $3,09 \pm 0,11$) и $1,99 \pm 0,17$ ($0,897 \pm 0,01$ у интактных животных) — свидетельствует об ускоренной утилизации конъюгатов.

Увеличение отношения ДК к ТК в изопропанольной фазе экстракта эритроцитов $1,43 \pm 0,23$ ($0,946 \pm 0,01$ у интактных животных), указывающее на изменение метаболизма ненасыщенных липидов по пути ПОЛ, ДК/ОДК, показывающее степень окисленности жирных кислот ($1,99 \pm 0,17$) ($0,897 \pm 0,01$ в контроле, $P < 0,05$), достоверное увеличение коэффициента распределения ДК $0,356 \pm 0,22$ ($0,153 \pm 0,13$ в контроле), ТК $0,432 \pm 0,11$ ($0,241 \pm 0,08$ в контроле), ОДК ($0,326 \pm 0,27$) ($0,229 \pm 0,01$ у интактных животных), ШО $3,72 \pm 0,51$ (при норме $2,62 \pm 0,64$) свидетельствуют об усилении реакций на всех этапах липопероксидации. Интенсивность накопления продуктов ПОЛ в значительной мере зависит от активности антиокислительной системы организма, которая при ЖДА снижена [1, 2, 10].

Таким образом, представленный метод одновременного определения содержания первичных, вторичных и конечных молекулярных продуктов липопероксидации в эритроцитах и плазме крови позволяет оценить не только изменения интенсивности ПОЛ, но и по отношению показателей, исследуемых в эритроцитах и в плазме крови, охарактеризовать меру выраженности обменных реакций между ними, а по изменению отношения ДК, ТК и ОДК эритроцитов к ДК, ТК и ОДК крови определить направление метаболизма ненасыщенных липидов, степень окисленности жирных кислот и установить индекс окисления.

М.Yu. Anoshina, I.I. Lanovenko

AN ESTIMATE OF THE FREE-RADICAL OXIDATION OF LIPIDS IN ERYTHROCYTES AND BLOOD PLASMA

Modification of the spectrophotometric method for simultaneous determination of the concentration of primary, secondary and final products of the free-radical oxidation of lipids in the plasma and erythrocytes of the blood. The method permits estimating intensity of processes of free-radical oxidation as well as correlation between concentration of the indices in the plasma and in the erythrocytes. Changes in the correlations of dienic, trienic and oxodienic conjugates permit determining direction of metabolism of unsaturated lipids, degree of oxidation of fatty acids and peroxidation index.

Research Institute of Hematology and Blood Transfusion,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аганова Е.Е. Активность супероксиддисмутазы у женщин с железодефицитными анемиями // Принципы организации гематологической помощи. — Л., 1987. — С. 82—83.
2. Владимирцов Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
3. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский В.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопр. мед. химии. — 1989. — 35, № 1. — С. 127—131.
4. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей в плазме крови // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 33—35.
5. Гончаренко М.С., Латинова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов // Там же. — 1985. — № 1. — С. 60—61.
6. Кагава Ясуо. Биомембраны: Пер. с япон. / Под ред. В.Е.Кагана. — М.: Высш. шк., 1985. — 303 с.
7. Каган В.Е., Орлов О.Н., Прилипко Л.А. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов // Итоги науки и техники. — Сер. Биофизика. — 1986. — 18. — 136 с.
8. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах // Лаб. дело. — 1984. — № 9. — С. 540—546.
9. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е., Лифшиц Р.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов // Вопр. мед. химии. — 1991. — 37, № 4. — С. 92—93.
10. Панкова Е.С. Глутатионредуктаза при старении эритроцитов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1990. — 21 с.
11. Ушкалова В.Н., Иоанидис Н.В., Деева З.М. и др. Анализ свободных радикалов липидов крови спектрофотометрическим, флюорометрическим и кинетическим методами // Лаб. дело. — 1987. — № 6. — С. 446—450.

Киев, науч.-исслед. ин-т гематологии и переливания крови
М-ва здравоохранения Украины

Материал поступил
в редакцию 06.04.94