

## ИМУННОФЕРМЕНТНЫЙ И ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СУММАРНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ

<sup>1</sup>Воронова О.А., <sup>1</sup>Короткова Е.И., <sup>1</sup>Плотников Е.В., <sup>2</sup>Гусакова А.М.,

<sup>2</sup>Суслова Т.Е., <sup>1</sup>Дорошко Е.В., <sup>1</sup>Петрова Е.В., <sup>1</sup>Кустова А.А.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»,  
Томск, e-mail: eikor@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «НИИ Кардиологии СО РАМН», Томск, e-mail: mag\_a@mail.ru

Проведена оптимизация способа пробоподготовки плазмы крови с учетом особенностей вольтамперометрического метода анализа биообъектов. Проведено сравнительное исследование суммарной активности антиоксидантов плазмы крови пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы на разных этапах оперативного вмешательства вольтамперометрическим и иммуноферментным методами. Показано, что во время операции после пережатия сонной артерии показатель суммарной активности антиоксидантов плазмы крови снижается, а после восстановления кровотока восстанавливается до первоначального состояния. Кроме того, установлена взаимосвязь сравнительных исследований антиоксидантного статуса вольтамперометрическим методом и иммуноферментным методом анализа с использованием тест-системы «OxyStat». Найдены оптимальные параметры пробоподготовки крови методами планирования эксперимента для оценки показателя суммарной активности антиоксидантов методом вольтамперометрии путем выбора оптимальных режимов центрифугирования. Показано, что полученные оптимальные условия эксперимента согласуются с общепринятой методикой приготовления крови для исследований.

**Ключевые слова:** суммарная активность антиоксидантов, плазма крови, сердечно-сосудистые заболевания, вольтамперометрия, иммуноферментный анализ

## ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY AND VOLTAMMETRIC METHODS FOR TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY DETERMINATION OF HUMAN PLASMA BLOOD OF CARDIOVASCULAR DISEASE

<sup>1</sup>Voronova O.A., <sup>1</sup>Korotkova E.I., <sup>1</sup>Plotnikov E.V., <sup>2</sup>Gusakova A.M.,

<sup>2</sup>Suslova T.E., <sup>1</sup>Dorozhko E.V., <sup>1</sup>Petrova E.V., <sup>1</sup>Kustova A.A.

<sup>1</sup>Tomsk Polytechnic University, Tomsk, e-mail: eikor@mail.ru;

<sup>2</sup>Tomsk Research Institute of Cardiology, Tomsk, e-mail: mag\_a@mail.ru

Estimate the significance of influencing factors was carried out in order to determine the more effective ranges of preparation of plasma blood samples. Comparative investigation of total antioxidant activity of human plasma blood (patients with cardiovascular disease) was carried out by voltammetric and enzyme-linked immunosorbent methods. It is shown that during operation after the carotid artery indicator total plasma antioxidant activity is reduced, and after restoration of blood flow is restored to the original state. In addition, comparative studies of the interrelation of the antioxidant status of voltammetric method and by ELISA assay using a test system «OxyStat». Optimal parameters of the blood sample preparation methods for the design of experiments for estimating the total antioxidant activity by voltammetry by selecting the optimum conditions centrifugation. We show that the optimum conditions of the experiment are consistent with the common method of preparing blood for research.

**Keywords:** total antioxidant activity, human plasma blood, cardiovascular disease, voltammetry, enzyme-linked immunosorbent assay

Определение суммарной активности антиоксидантов в крови человека является важной задачей для медико-биологических исследований, поскольку антиоксидантная активность определяет защитную систему организма для борьбы с окислительным стрессом. Органические пероксиды и гидропероксиды являются первыми продуктами реакций, происходящих между клеточными компонентами и активными формами кислорода (АФК) [3].

Участие АФК в сердечно-сосудистой патологии в настоящее время не оставляет сомнений наряду с чрезмерной активации перекисного окисления липидов они вызывают также и окислительную модификацию белков, приводящую к патоло-

гическим изменениям их конформации, свойств и функций. К настоящему времени накоплены многочисленные данные, позволяющие рассматривать окислительный стресс в качестве одного из ключевых патогенетических компонентов, инициирующих возникновение и развитие сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6]. Поэтому исследование антиоксидантного статуса организма по оценке суммарного количества антиоксидантов в биообъектах, а также разработке способов оценки их активности в различных объектах в норме и при патологических состояниях представляется весьма перспективным направлением как в современной медицинской диагностике, так и для научных разработок.

Кровь является сложной субстанцией для исследований, ее антиоксидантный состав обусловлен, прежде всего, наличием аминокислот, мочевой кислоты, витаминов Е и С, глюкозы, ферментов, гормонов, неорганических солей, а также промежуточных и конечных продуктов метаболизма [2]. Многообразие механизмов антиоксидантного действия каждого компонента привело к разнообразию методов оценки антиоксидантной активности (АОА) сыворотки крови. В большинстве случаев под суммарной АОА понимается некая интегральная составляющая, характеризующая потенциальную возможность антиоксидантного действия всех компонентов сыворотки крови, причем в совокупности их взаимодействия между собой в этой сложной системе, с учетом потенциального синергизма их кооперативного антиоксидантного действия и вклада минорных антиоксидантов [1, 9]. Несмотря на многообразие адекватных систем оценки АОА биологических жидкостей [4, 10], для правильной интерпретации полученных результатов много задач остаются нерешенными. Одним из главных является сопоставление результатов исследований, выполненных разными методами на разных модельных системах.

**Цель работы** – исследование суммарной антиоксидантной активности антиоксидантов плазмы крови пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы двумя независимыми методами (вольтамперометрический и иммуноферментный) на разных этапах оперативного вмешательства.

### Материал и методы исследования

#### *Пробоподготовка сыворотки крови*

В качестве объекта исследования использована плазма крови пациентов, перенесших аорто-коронарное шунтирование в условиях искусственного кровообращения с применением гипоксического преоксидирования на базе кардиохирургического отделения НИИ кардиологии СО РАМН г. Томска.

Для получения плазмы забор крови проводился натощак из локтевой вены в специальную вакуумную систему «Vacuett®» (с 6% ЭДТА). Плазма крови получалась центрифугированием пробирок с цельной кровью при 2000 об./мин в течение 10 минут при комнатной температуре.

#### *Вольтамперометрический метод*

Вольтамперометрический метод определения суммарной активности антиоксидантов плазмы крови заключается в регистрации вольтамперограмм катодного восстановления кислорода без добавления и с последующим добавлением исследуемых образцов (0,1 мл) в раствор фонового электролита в диапазоне потенциалов от 0 до -1,0 В. Модельной реакцией служит процесс электровосстановления кислорода (ЭВ  $O_2$ ), идентичный восстановлению кислорода в клетках и тканях организма.

Измерения проводились на автоматизированном вольтамперометрическом анализаторе «ТА-2» (ООО «Томьаналит» г. Томск, Россия) с подключенной к нему электрохимической ячейкой, состоящей из индикаторного стеклоуглеродного электрода, хлорид-серебряных электродов сравнения и вспомогательного электрода. В качестве фонового электролита использовался фосфатный буфер с рН 6,86. Методика измерения суммарной активности антиоксидантов сыворотки крови подробно изложена в [7].

Степень изменения тока ЭВ  $O_2$  является показателем антиоксидантной активности исследуемых веществ. Для оценки суммарной активности антиоксидантов сыворотки крови использовался кинетический критерий, отражающий количество активных кислородных радикалов, прореагировавших с антиоксидантом за минуту времени,  $K$  (мкмоль/л мин):

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

где  $I$  – ток ЭВ  $O_2$  в присутствии сыворотки крови в фоновом растворе, мкА;  $I_0$  – ток ЭВ  $O_2$  в ее отсутствии (мкА);  $C_0$  – исходная концентрация кислорода в фоновом растворе (мкмоль/л);  $t$  – время протекания реакции взаимодействия АО с кислородом и его радикалами, мин.

#### *Иммуноферментный метод*

Иммуноферментный метод анализа проведен с использованием полуавтоматического иммуноферментного анализатора с открытой системой (т.е. позволяющего работать с реактивами и наборами различных производителей).

Фотометрические измерения проводились на микропланшетном ридере АИФ-Ц-01С (Россия). АИФ-Ц-01С используется для анализа оптической плотности жидких биологических проб в планшетах для иммуноферментного анализа с последующей обработкой результатов встроенной микро-ЭВМ, для применения в КДЛ-лабораториях, лечебно-профилактических и научно-исследовательских учреждениях санитарно-эпидемиологического профиля. Содержание общих биопероксидов определяли в плазме крови с помощью тест-системы «OxyStat»). Принимая во внимание прямую зависимость между циркулирующими биологическими пероксидами и присутствием свободных радикалов, можно сказать, что результаты, полученные с использованием набора «OxyStat», позволяют оценить окислительный статус в биологических образцах.

Концентрация пероксидов в предложенном методе определяется с использованием реакции циркулирующих биологических пероксидов с пероксидазой, а затем с ферментным субстратом. Интенсивность развивающейся окраски при взаимодействии с пероксидазой (1 определение) и после добавления стоп-раствора (2 определение) измеряли фотометрически с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм. Калибратор используется для расчета концентрации циркулирующих биологических пероксидов в образце (калибровка по одной точке). Разница между значениями, полученными при 1-м и при 2-м измерениях, пропорциональна концентрации перекиси в образцах.

Расчет концентрации биопероксидов в плазме крови образцов проводился согласно следующей формуле:

$$C_{\text{ОБРАЗЦА}} [\text{мкмоль / л}] = \frac{\Delta\text{ОП}_{\text{ОБРАЗЦА}} \times C_{\text{СТАНДАРТА}} [\text{мкмоль / л}]}{\Delta\text{ОП}_{\text{СТАНДАРТА}}}$$

где  $\Delta OP$  – разница оптических плотностей исследуемых образцов и стандарта, полученных при 1-м и при 2-м измерениях.

### Результаты исследование и их обсуждение

*Определение оптимальных условий пробоподготовки крови человека для оценки суммарной активности антиоксидантов в ней*

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 ЭВ  $O_2$  в присутствии крови, оценки ее адекватности и оценки значимости коэффициентов полученного уравнения регрессии использовался полный факторный эксперимент [8]. Варьируемыми факторами служили скорость ( $X_1$ ) и время ( $X_2$ ) центрифугирования крови. В качестве функции отклика использовали показатель суммарной активности антиоксидантов сыворотки крови.

В результате работы получена математическая модель, адекватно описывающая процесс. Таким образом, уравнение математической модели выглядит следующим образом:

$$Y = 0,300 + 0,086 X_1 + 0,139 X_2.$$

Расчеты показали, что оба фактора положительно влияют на функцию отклика, наибольшее влияние оказывает время центрифугирования сыворотки крови.

Для нахождения точки оптимума реализован метод крутого восхождения и получена двухфакторная поверхность отклика (рис. 1).

На основании полученных результатов получена поверхность отклика в виде гиперболоида в форме седла и определены оптимальные условия пробоподготовки для определения суммарной активности антиоксидантов в крови:  $\omega = 2000$  об./мин,  $t = 10$  мин. Полученные оптимальные условия эксперимента согласуются с общепринятой методикой приготовления крови для исследований.

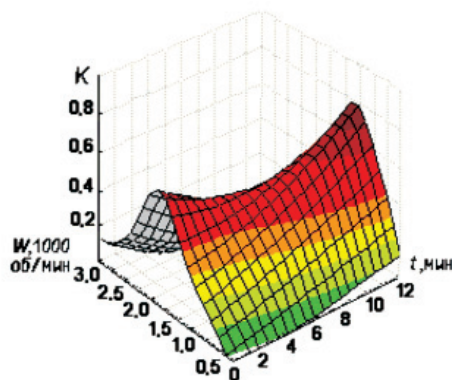


Рис. 1. Поверхность отклика суммарной активности антиоксидантов крови человека в зависимости от условий центрифугирования (время, мин и скорость вращения, об./мин)

*Сравнительные исследования вольтамперометрическим и иммуноферментным методами*

Сравнительное исследование антиоксидантного статуса включало определение коэффициента суммарной активности антиоксидантов крови и показателя общей концентрации циркулирующих пероксидов на 4 этапах: до начала оперативного вмешательства, после снятия зажима с аорты, через 6 часов после искусственного кровообращения и через сутки после операции. В таблице представлены результаты количественной оценки суммарной антиоксидантной активности плазмы крови, измеренной двумя независимыми методами на разных этапах оперативного вмешательства (выборка из 15 человек).

Согласно полученным результатам, прослеживается зависимость между значениями суммарной активности антиоксидантов и показателя общей концентрации циркулирующих пероксидов по периоду забора крови. Для большинства пациентов до оперативного вмешательства наблюдается некий средний уровень суммарной активности антиоксидантов плазмы крови, который во время операции уменьшается.

Низкий уровень у пациентов во время операции после пережатия сонной артерии, по-видимому, объясняется депрессивным состоянием организма и связан с уменьшением образования кислородных радикалов во время процедуры гипоксического preconditionирования.

После восстановления кровотока почти у всех пациентов значения суммарной активности антиоксидантов плазмы крови и показателя общей концентрации циркулирующих пероксидов восстанавливаются до первоначального состояния, что соответствует восстановлению (возвращению) парциального давления кислорода к норме.

Значения показателя суммарной активности антиоксидантов плазмы крови, измеренные двумя различными методами на разных этапах оперативного вмешательства

Шифр пациента	Код образца	ВА метод К, мкмоль/л-мин	ИФА ОхуStat, мкмоль/л
1	A	0,78 ± 0,03	609,7
	B1	0,13 ± 0,06	134,7
	B2	0,17 ± 0,02	176,0
	C	0,53 ± 0,02	497,7
2	A	0,12 ± 0,06	390,7
	B1	0,038 ± 0,004	5,1
	B2	0,042 ± 0,005	84,2
	C	0,31 ± 0,04	480,8
3	A	0,076 ± 0,002	464,0
	B1	0,015 ± 0,005	0,8
	B2	0,045 ± 0,007	118,7
	C	0,082 ± 0,003	518,7
4	A	0,16 ± 0,03	407,6
	B1	0,041 ± 0,005	14,3
	B2	0,083 ± 0,007	215,6
	C	0,23 ± 0,03	454,7
5	A	0,21 ± 0,06	502,7
	B1	0,063 ± 0,004	29,5
	B2	0,11 ± 0,02	503,6
	C	0,25 ± 0,07	557,5

Примечание: А – до начала оперативного вмешательства; В1 – после снятия зажима с аорты; В2 – через 6 часов после искусственного кровообращения; С – через сутки после операции.

Кроме того, наблюдается корреляция между значениями кинетического критерия, полученного с помощью вольтамперометрического метода, и значениями концентраций биопероксидов в плазме крови, полученными с помощью тест-системы «ОхуStat» (рис. 2).

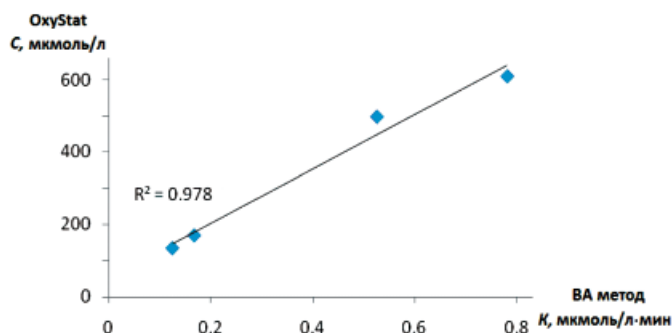


Рис. 2. Зависимость кинетического критерия К и показателя тест-системы ОхуStat на примере пациента № 1

Таким образом, в работе с помощью метода катодной вольтамперометрии исследована суммарная активность антиоксидантов крови пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы на разных этапах оперативного вмешательства. Проведено сравнение двух независимых методов (иммуноферментного и вольтамперометриче-

ского). Прослеживается зависимость между значениями суммарной активности антиоксидантов плазмы крови по периоду забора крови. Показано, что во время операции показатель суммарной активности антиоксидантов снижается, а после восстановления кровотока восстанавливается до первоначального состояния

Кроме того, наблюдается взаимосвязь между результатами сравнительных исследований антиоксидантного статуса вольтамперометрическим методом и иммуноферментным методом анализа с использованием тест-системы «OxyStat».

### Выводы

В работе найдены оптимальные параметры пробоподготовки крови методами планирования эксперимента для оценки показателя суммарной активности антиоксидантов методом вольтамперометрии путем выбора оптимальных режимов центрифугирования. Показано, что полученные оптимальные условия эксперимента согласуются с общепринятой методикой приготовления крови для исследований.

Проведены сравнительные исследования определения суммарной активности антиоксидантов в плазме крови пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы на разных этапах оперативного вмешательства. Показано, что во время операции после пережатия сонной артерии показатель суммарной активности антиоксидантов плазмы крови снижается, а после восстановления кровотока восстанавливается до первоначального состояния. Кроме того, установлена взаимосвязь сравнительных исследований антиоксидантного статуса вольтамперометрическим методом и иммуноферментным методом анализа с использованием тест-системы «OxyStat».

*Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК № 14.740.11.1369).*

*Работа выполнена в рамках государственного задания «Наука» по теме 3.2702.2011.*

### Список литературы

1. Белякова Н.А., Семеско С.Г. Антиоксидантная активность биологических жидкостей человека. Методология и клиническое значение // Эфферентная терапия. – 2005. – Т. 11, № 1. – С. 5–23.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1982. – 750 с.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
4. Громовая В.Ф., Шаповал Г.С., Миронюк И.Е., Луик А.И. // Журн. общ. химии. – 1997. – Т. 67, № 3. – С. 510–513.

5. Меньщикова Е.Б., Зенков Е.К., Сафина А.Ф. Механизмы развития окислительного стресса при ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда // Успехи совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 3 – С. 362–373.

6. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Свободнорадикальная модификация липопротеинов крови и атеросклероз // Биол. мембраны. – 1993. – Т. 10, № 4. – С. 341–382.

7. Плотников Е.В., Короткова Е.И., Дорошко Е.В., Букель М.В., Линерт В. // Зав. лаборатория. Диагностика материалов. – 2009. – Т. 75, № 12. – С. 14–17.

8. Фиалко М.Б., Кумок В.Н. Лекции по планированию эксперимента. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1977. – 131 с.

9. Young I.S. Measurement of total antioxidant capacity // J. Clin. Pathol. – 2001. – Vol. 54. – № 5. – P. 339.

10. Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C., Pogorel'tzev V.I. Electrochemical determination of the total antioxidant capacity of human plasma // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2005. – Vol. 381, № 8. – P. 1546–1551.

### References

1. Belyakov N.A., Semesko S.G. Effereentnaya Terapiya, 2005, Vol. 11, no. 1, pp. 5–23.

2. Berezov T.T., Korovkin, B.F. Biologicheskaya khimiya (Biological Chemistry), Moscow: Medicine, 1990.

3. Vladimirov E.A., Archakov, A.I. Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranah (Peroxide Oxidation of Lipids in Biological Membranes), Moscow: Nauka, 1972.

4. Gromovaya V.F., Shapoval G.S., Mironyuk I.E., Luik A.I. Zhurnal obschey khimii, 1997, Vol. 67, no. 3, pp. 510–513.

5. Menshchicova E.B., Zenkov N.K., Safina A.F. Uspekhi Sovremennoi Biologii, 1997, Vol. 117, no. 3, pp. 362–373.

6. Panasenko O.M., Sergienko V.I. Biologicheskie membrany, 1993, Vol. 10, no. 4, p. 341–382.

7. Plotnikov E.V., Korotkova E.I., Dorozhko E.V., Bukel M.V., Linert V. Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov, 2009, Vol. 75, no. 12, p. 14–17.

8. Fialko M.B., Kumok V.N. Lektsii po planirovaniyu eksperimenta (Lectures on experimental design methods)

9. Young I.S. Measurement of total antioxidant capacity // J. Clin. Pathol. 2001, Vol. 54, no. 5, pp. 339.

10. Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C., Pogorel'tzev V.I. Electrochemical determination of the total antioxidant capacity of human plasma // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2005. Vol. 381, no. 8. pp. 1546–1551.

### Рецензенты:

Слепченко Г.Б., д.х.н., профессор кафедры физической и аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск;

Колпакова Н.А., д.х.н., профессор кафедры физической и аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск.

Работа поступила в редакцию 01.07.2013.