

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

В.Н. Андреев¹, доктор химических наук, **А.К. Евсеев**², кандидат химических наук,
Г.Р. Гараева², кандидат химических наук, **М.М. Гольдин**², доктор химических наук, профессор

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

²Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

E-mail: anatolevseev@gmail.com

Разработан электрохимический метод определения уровня антиоксидантов в биологических средах. Сопоставлены данные анализа редокс-потенциала и антиоксидантной активности сыворотки крови у практически здоровых людей (n=31). Исследовано влияние на величину редокс-потенциала растворов альбумина, содержания некоторых антиоксидантов и окислителей. Найдена корреляция величин редокс-потенциала и уровня антиоксидантов сыворотки крови у практически здоровых. Показана возможность применения комплексного анализа для мониторинга состояния пациентов после трансплантации почки.

Ключевые слова: редокс-потенциал, уровень антиоксидантов, сыворотка крови, платиновый электрод, трансплантация

BLOOD SERUM REDOX POTENTIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY COMPARISON

V.N. Andreev¹, A.K. Evseev², G.R. Garaeva², M.M. Goldin²

¹A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS, Moscow;

²N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow

Electrochemical method of antioxidants level determination in biological media was developed. The comparison of the blood serum redox potential and antioxidant activity for practically health people (n=31) was carried out. The effect of added antioxidants and oxidants to level of human albumin solution redox potential was investigated. Correlation between blood serum redox potential value with antioxidants level for practically health people was found. Simultaneous monitoring of redox potential with antioxidants level in patients after kidney transplantation was done.

Key words: redox potential, antioxidants level, blood serum, platinum electrode, transplantation

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к оценке баланса про- и антиоксидантной систем организма обусловлен возможностями использования этих данных для разработки диагностических и прогностических критериев оценки состояния пациентов с различными патологическими состояниями.

При исследовании баланса про- и антиоксидантной систем внимание, как правило, уделяется оценке одной из них. Общепринятым маркером процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) является малоновый диальдегид [4]. Существуют также методы определения антиоксидантов, которые различаются по типу источника окисления, самого окисляемого соединения и способу его детектирования [7]. Однако большинство из этих методов нельзя использовать для определений в биологических средах, кроме того, несовершенство методов создает трудности при сравнении результатов, полученных разными исследователями [9].

С электрохимической точки зрения, процессы, характерные для про- и антиоксидантной систем, можно описать суммой окислительно-восстановительных ре-

акций [15]. Интегральным отражением окислительно-восстановительных процессов, протекающих в организме, является величина редокс-потенциала (РП) биологических сред организма (кровь, плазма крови, сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость и др.) [19]. Суть электрохимического метода определения РП заключается в измерении разности потенциалов между инертным измерительным электродом (платина, золото) и электродом сравнения [2].

Первые попытки измерения РП в биологических средах человека относятся к 1930-м годам [11, 26], однако лишь в конце 60-х годов прошлого века была найдена корреляция РП с некоторыми биохимическими показателями [12, 13, 21, 22]. Поиск корреляций величины РП с указанными факторами продолжается до настоящего времени. Например, корреляция РП с ПОЛ обнаружена в 2006 г. и подтверждена лишь в 2009 г. [14, 16, 20]. К настоящему времени установлены взаимосвязи величины РП с возрастом пациента [25], гипо- и гипертеродными состояниями [17], онкологическими заболеваниями [24], туберкулезом [24], инфекционными заболеваниями [3], геморра-

гическим шоком [6, 27], нейротравмой [19], мульти-органной недостаточностью [23], проведением операции коронарного шунтирования [18], терапией с применением гипербарической оксигенации [1].

Однако несмотря на простоту и достаточно широкое распространение электрохимического метода измерения РП, имеются трудности при проведении измерений в биологических средах. Эти трудности связаны с тем, что в окислительно-восстановительных системах, характерных для биологических сред, необходимо учитывать не только окислительно-восстановительные свойства исследуемой среды, но и состояние поверхности электрода [5].

Таким образом, с помощью измерения величин редокс-потенциалов плазмы и сыворотки крови появляется возможность определять состояние баланса про- и антиоксидантных систем организма и связанных с этим процессов. Данные измерения являются аналитическим инструментом для разработки диагностических и прогностических критериев при мониторинге состояния пациентов с различными патологическими состояниями. Поскольку величина РП, как указано выше, является интегральным показателем, отражающим состояние равновесия между про- и антиоксидантами в организме, представляется полезным параллельно с ее измерением определять также антиоксидантную активность тестируемой среды.

Однако отсутствие унифицированного методического подхода к измерению редокс-потенциала, затрудняет, а порой делает невозможным сопоставление данных, полученных разными авторами. Ранее [15] нами была разработана унифицированная методика электрохимического определения РП.

Целью данного исследования стали разработка электрохимического метода определения уровня антиоксидантов в биологических средах и сопоставление данных одновременных измерений РП и антиоксидантной активности (АОА) сыворотки крови у

практически здоровых людей для выявления влияния уровня антиоксидантов на величину РП.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы сульфат натрия (Лабтех, «хч»), сульфит натрия (Лабтех, «хч»), альбумин человеческий (Октафарма, 20% раствор), L-аскорбиновая кислота (Sigma Aldrich, 99%), персульфат натрия (Лабтех, «хч»), п-бензохинон (Диаэм, «ч»), гидрохинон (Merck, 99%).

Измерения РП проводили, согласно [15], с помощью гладкого поликристаллического платинового электрода с рабочей площадью $3,3 \cdot 10^{-2} \text{ см}^2$, хлорсеребряный электрод использовали в качестве электрода сравнения. Величину РП и ее изменения в течение 30 мин фиксировались в непрерывном режиме с помощью потенциостата IPC-Compart (НПФ «Вольта»). Объем образцов для исследования составлял 2 мл.

Сыворотку крови получали центрифугированием цельной крови практически здоровых людей ($n=31$) и пациентов после трансплантации почки ($n=5$) при 1500 об в течение 15 мин в центрифуге CR 3.12 (Jouan).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения АОА тестируемой среды было предложено использовать метод циклической вольтамперометрии. К 4 мл водного раствора медиаторной пары п-бензохинон/гидрохинон (2,5 мМ/2,5 мМ) в фосфатном буфере (рН 7,4) добавляли 1 мл исследуемой пробы. Фиксировали изменение величины спада тока восстановления на поляризационной кривой (рис. 1).

При исследовании РП сыворотки крови 31 практически здорового человека было обнаружено, что величина показателя смещается во времени в отрицательную область (рис. 2). Детальный анализ показал, что зависимость РП от времени является логарифмической [8].

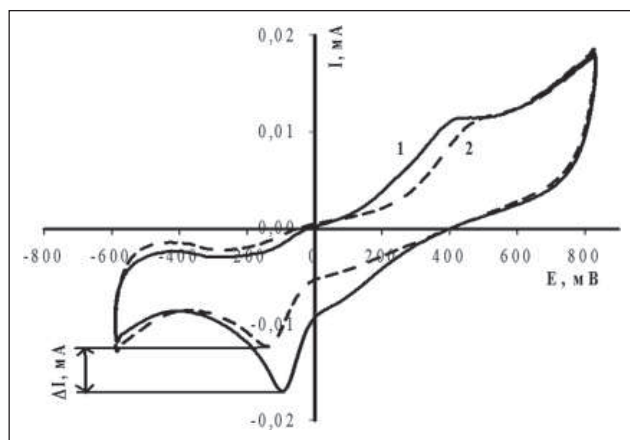


Рис. 1. Вольтамперная кривая смеси п-бензохинон/гидрохинон: 1 – фоновый раствор; 2 – при добавлении сыворотки крови

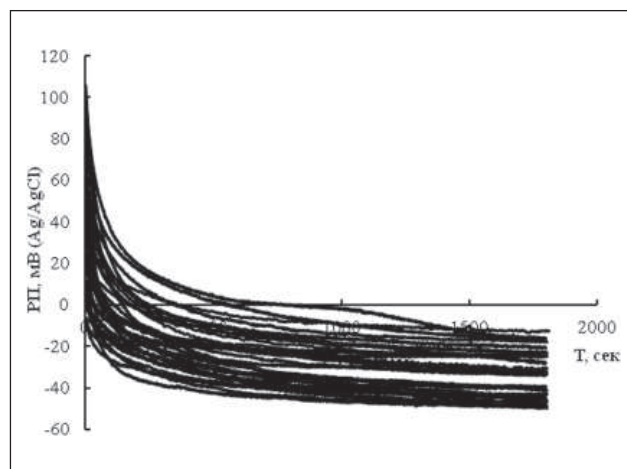


Рис. 2. РП сыворотки крови 31 практически здорового человека

Одной из причин сдвига потенциала в отрицательную область может являться адсорбция белков сыворотки крови. Действительно, сообщалось [10] об адсорбции сывороточного альбумина на поверхности платинового электрода. В рамках настоящего исследования обнаружено, что при добавлении альбумина к физиологическому раствору величина РП смещается во времени в область положительных потенциалов (рис. 3). Данные, представленные на рис. 2, указывают, таким образом, на противоположную направленность сдвига РП во времени для сыворотки крови по сравнению с таковой в водных растворах. Следовательно, можно сделать вывод, что сдвиг РП в сторону более отрицательных значений в сыворотке крови не связан с адсорбцией альбумина на поверхности электрода.

Еще одной из причин смещения РП в отрицательную область потенциалов может быть присутствие в сыворотке крови антиоксидантов. Действительно, добавление аскорбиновой кислоты к водным растворам альбумина привело к смещению величины РП в отрицательную область (рис. 4).

Таким образом, можно предположить, что сдвиг РП в отрицательную область значений связан с наличием в сыворотке крови антиоксидантов. Чтобы проверить это утверждение, было решено нейтрализовать действие антиоксидантов сыворотки крови с помощью добавок оксиданта к сыворотке крови. Было показано, что добавление к сыворотке крови персульфата натрия обуславливает отсутствие сдвига величины РП, а более высокие его концентрации приводят к сдвигу величины РП в область положительных значений потенциала (рис. 5). Приведенные данные доказывают, что величина РП действительно отражает состояние баланса про- и антиоксидантной систем организма.

Далее были измерены величины РП и АОА в образцах сыворотки крови 31 практически здорового человека. Сравнение полученных данных (рис. 6) по-

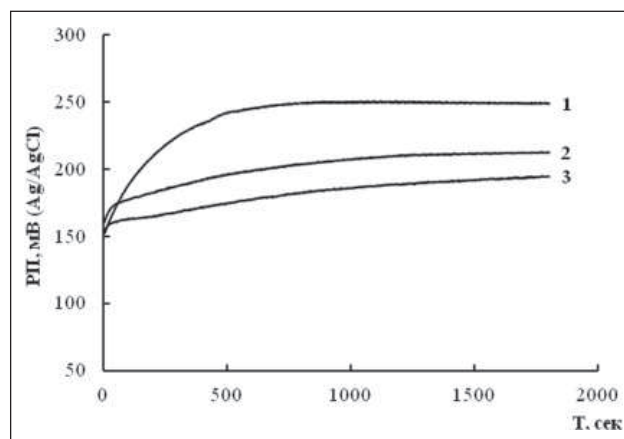


Рис. 3. Зависимость РП растворов альбумина от концентрации: 1 – 0,9% NaCl, 2 – 10% раствора альбумина, 3 – 20% раствора альбумина

казало, что во всех случаях направление и величина сдвига РП совпадают с таковыми АОА, что свидетельствует о непосредственной связи РП с уровнем АОА биологической среды. На основании этих данных также можно выделить области величин РП и АОА, соответствующие коридорам референсных значений уровня антиоксидантов и величин РП плазмы у практически здоровых людей.

Важно было выяснить вопрос о связи уровня антиоксидантов с патологическими состояниями различной этиологии. Особый интерес представляют пациенты после трансплантации органов, которые постоянно находятся на поддерживающей терапии иммуносупрессивными препаратами.

При исследовании пациентов после трансплантации почки было выявлено, что, как правило, РП коррелирует с АОА сыворотки крови. Однако в ряде случаев была обнаружена противоположная динамика.

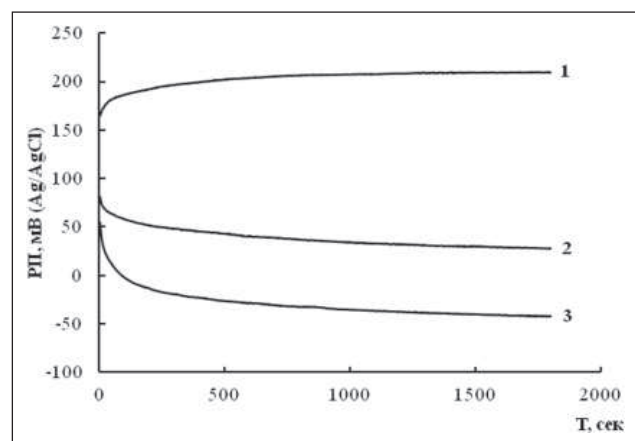


Рис. 4. РП 10% раствора альбумина от концентрации аскорбиновой кислоты: 1 – исходный раствор; 2 – $5,7 \cdot 10^{-4}$ М аскорбиновой кислоты; 3 – $2,8 \cdot 10^{-3}$ М аскорбиновой кислоты

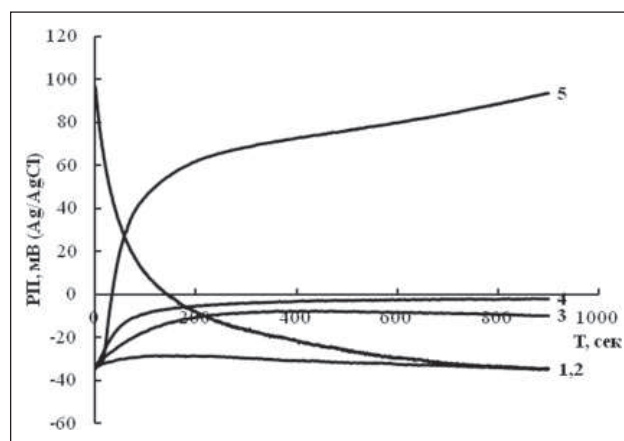


Рис. 5. Влияние добавок персульфата натрия на РП сыворотки крови. 1 – сыворотка крови, 2 – 10^{-6} М $Na_2S_2O_8$, 3 – 10^{-5} М $Na_2S_2O_8$, 4 – 10^{-4} М $Na_2S_2O_8$, 5 – 10^{-3} М $Na_2S_2O_8$

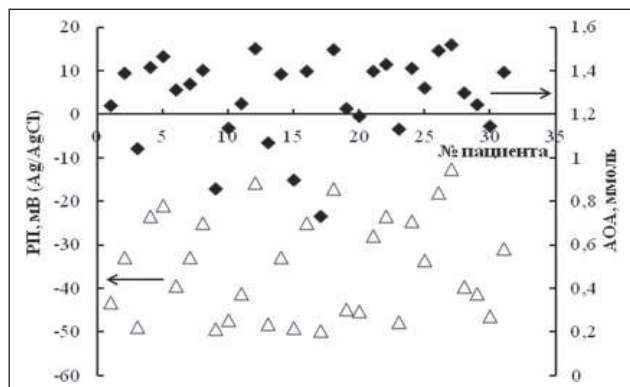


Рис. 6. Сравнение РП (обозначено треугольниками) и АОА (ромбы) у практически здоровых обследованных ($n=31$)

Так, у пациента С. (рис. 7) с 8-х по 12-е сутки обнаружено смещение РП в отрицательную область потенциалов, что сопровождалось падением АОА. Возможно, данное явление связано с проводимым в послеоперационном периоде лечением. Подобные наблюдения могут сигнализировать о дисбалансе функционирования АОА и прооксидантной систем пациента и необходимости коррекции его лечения. Обнаруженный эффект требует дополнительных исследований.

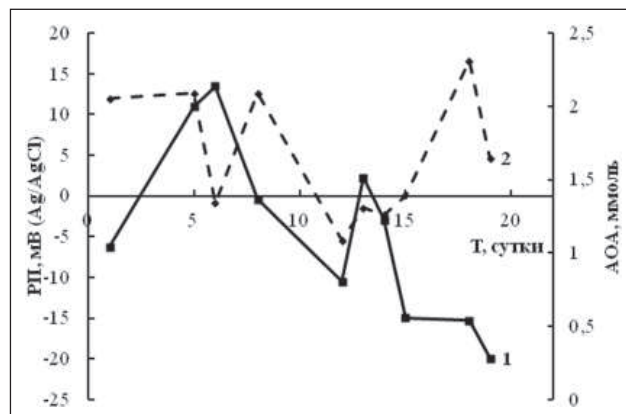


Рис. 7. Данные РП (1) и АОА (2) сыворотки крови пациента С. с трансплантированной почкой

ВЫВОДЫ

1. Разработан электрохимический метод определения АОА биологических сред с использованием медиаторной пары п-бензохинон/гидрохинон.
2. Обнаружена корреляция величин РП и уровня антиоксидантов сыворотки крови у практически здоровых людей.
3. Предположено, что отсутствие корреляции величин РП и содержания антиоксидантов в сыворотке крови пациентов после трансплантации почки может быть связано с необходимостью коррекции лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдин М.М., Ромасенко М.В., Евсеев А.К., Левина О.А., Петриков С.С., Алещенко Е.И., Крылов В.В. Оценка эффективности использования гипербарической оксигенации при острой церебральной патологии с помощью электрохимической методики // *Нейрохирургия*. – 2010; 4: 33–9.
2. Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Цирлина Г.А. *Электрохимия*. – М.: Химия, Колосс, 2008, 672 с.
3. Джикия И.В., Рижвадзе М.А., Джангидзе М.А. Окислительно-восстановительный потенциал крови и состоятельность системы энергообеспечения при цитомегаловирусной инфекции у беременных // *Georgian medical news*. – 2006; 5 (134): 28–31.
4. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006, 556 с.
5. Михаэлис Л. Окислительно-восстановительные потенциалы и их физиологическое значение. Под ред. Складовского С.Н., М.: ГХТИ, 1932, 160 с.
6. Серов В.И. Изменения кровотока, напряжения и диффузии кислорода, окислительно-восстановительного потенциала в коре головного мозга при геморрагическом шоке и гипербарической оксигенации // *Бюллетень гипербарической биологии и медицины*. – Воронеж: Воронеж, гос. мед. акад. – 1994; 2: 5–9.
7. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // *Химия растительного сырья*. – 2004; 3: 63–75.
8. Хубутия М.Ш., Евсеев А.К., Чжао А.В., Александрова И.В., Гольдин М.М., Салиенко А.А. Мониторинг редокс-потенциала сыворотки крови для диагностики осложнений при лечении пациентов с трансплантированной печенью // *Трансплантология*. – 2012; 1–2: 60–4.
9. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Проблема определения содержания антиоксидантов // *Компетентность*. – 2009; 69 (8): 50–53.
10. Anzai J., Guo B., Osa T. Electrochemically accelerated adsorption of serum albumin on the surface of platinum and gold electrodes // *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. – 1994; 42 (11): 2391–3.
11. Bembe C., Dietrich S. Zur Messung oxydoreductiver Potentiale im Blut // *Zeitschrift für Die Gesamte Experimentelle Medizin*. – 1941; 109: 546–65.
12. Bernard C., Gallinet J., Conde C. et al. Interrelation between the blood redox potential and exercise induced variations of the biochemical characteristics of blood // *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. – 1991; 25: 45–70.
13. Grosz H., Farmer B. Reduction-Oxidation Potential of Blood as a Function of Partial Pressure of Oxygen // *Nature*. – 1967; 213 (5077): 717–8.
14. Kolis J. Oxidative stress in sepsis: a redox redux // *J. Clin. Invest.* – 2006; 116 (4): 860–3.
15. Khubutiya M., Evseev A., Kolesnikov V. et al. Measurements of Platinum Electrode Potential in Blood and Blood Plasma and Serum // *Russian J. of Electrochemistry*. – 2010; 46 (5): 537–41.
16. Margină D., Grădinaru D., Mifrea N. Development of a potentiometric method for the evaluation of redox status in human serum // *Revue Roumaine de Chimie*. – 2009; 54 (1): 45–8.
17. Marmasse C., Grosz H. Direct Experimental Evidence of a Functionally Active Electron Transport System in Human Blood // *Nature*. – 1964; 202 (4927): 94.
18. Rae S., Palazzo R., Metz H. et al. Redox Potential Measurements of Plasma in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft and Its Clinical Significance // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 1997; 38: 151–6.
19. Rael L., Bar-Or, Mains C. et al. Plasma Oxidation-Reduction Potential and Protein Oxidation in Traumatic Brain Injury // *J. of neurotrauma*. – 2009; 26: 1203–11.
20. Rael L., Bar-Or, Scatotto K. et al. Injury severity and serum amyloid A correlate with plasma oxidation-reduction potential in multi-trauma patients: a retrospective analysis // *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. – 2009; 17: 57.
21. Rael L., Bar-Or, Amann R. et al. Oxidation-reduction potential and paraoxonase-arylesterase activity in trauma patients // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007; 361: 561–5.
22. Taniguchi S. The significance of arterial redox potential measurement by Vincent's method in evaluating the hemorrhagic shock state of rabbits // *Masui*. – 1993; 42 (3): 387–93.
23. Taniguchi S., Kodama K., Matsuyama H. et al. Contribution of Arterial redox potential measurement to the care of critically ill patients // *J. of Anesthesia*. – 1987; 1 (2): 125–31.
24. *The Redox Potential of the Blood in Vivo and in Vitro* / Ziegler E. – Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Publisher. – 1965; 196.
25. Van Rossum J., Schamhart D. Oxidation-reduction (redox) potentiometry in blood in geriatric conditions: A pilot study // *Experimental Gerontology*. – 1991; 26 (1): 37–43.
26. Waterman N. Ueber Aenderungen des Redoxpotentials im Serum durch Röntgenbestrahlung // *Z. Krebsforsch.* – 1933; 38: 301.
27. White N., Collinson M., Boe R. et al. Redox Monitoring Reveals Increased Susceptibility of Whole Blood to Oxidative Stress During Hemorrhagic Shock // *Circulation (Resuscitation Science Symposium)*. – 2008; 118:S.1488, Abstract 198.