

УДК 543.426;577.169

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОПЕРОКСИДОВ ЛИПИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

© 2017 г. Е. В. Проскурнина^{*,1}, А. А. Джатдоева^{*}, Е. Н. Лобиченко^{*},
Р. И. Шалина^{**}, Ю. А. Владимиров^{*}

^{*}Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины
119192 Россия, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 50

^{**}Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, педиатрический факультет
117197 Россия, Москва, ул. Островитянова, 1

¹E-mail: proskurnina@gmail.com

Поступила в редакцию 08.09.2016 г.

После доработки 03.12.2016 г.

Для оценки окислительного стресса в клинических условиях была разработана методика хемилюминесцентного определения суммарного содержания гидропероксидов липидов, основанная на реакции их окисления в присутствии микропероксидазы и активатора хемилюминесценции изолюминола в среде боратного буферного раствора (рН 10.0). Предел обнаружения гидропероксида линолевой кислоты 16 нМ. Методика использована для определения гидропероксидов липидов в липопротеинах фолликулярной жидкости и плазмы крови пациенток, проходящих процедуру экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: окислительный стресс, пероксидация липидов, активированная хемилюминесценция, микропероксидаза, липопротеины плазмы крови, липопротеины фолликулярной жидкости.

DOI: 10.7868/S0044450217050097

В настоящее время признано, что активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в нормальной физиологии живого организма, участвуя в развитии ряда патологий, когда избыток АФК приводит к нарушению сигнальных путей и прямому повреждению молекул и клеток [1]. В результате атаки свободного радикала на молекулу липида образуется в качестве промежуточного соединения гидропероксид. Гидропероксиды накапливаются при различных патологических состояниях и вызывают различные повреждения молекул в клетке напрямую или усугубляют окислительный стресс, активируя НАДФН-оксидазу [2], участвуя в образовании синглетного кислорода [3], индуцируя апоптоз [4]. Именно окисленные липиды в плазме крови являются фактором риска атеросклеротической болезни [5], вызывают повреждение кардиомиоцитов и нарушение их электрической активности [6]. С точки зрения практической медицины представляет интерес определение общего содержания липидных гидропероксидов, поскольку их роль в развитии повреждений определяется именно активностью пероксидной группы и мало зависит от радикала. Цель определения гидропероксидов липидов, с

одной стороны, – оценка глубины протекания окислительного стресса в липидах, с другой стороны, – оценка эффективности антиоксидантной терапии.

Разработано много методов определения гидропероксидов липидов, прежде всего, в пищевых продуктах. Это – неспецифическое и малочувствительное иодометрическое титрование с колориметрическим [7] и потенциометрическим определением конечной точки титрования [8]. Другой распространенный метод основан на окислении ионов железа(II) гидропероксидами липидов в кислой среде, содержащей краситель [9] со спектрофотометрическим определением образующегося окрашенного комплекса. Метод неспецифичен для гидропероксидов липидов, так как сигнал дают многие другие соединения, способные окислять ионы железа(II). ИК-спектроскопию с Фурье-преобразованием применяют после предварительной реакции трифенилфосфина с гидропероксидами [10]. Метод надежен и информативен, однако на практике неприменим для рутинных клинических исследований. Хроматографические методы позволяют определить количество гидропероксида индивидуального липида [11]. описа-

ны методики хемилюминесцентного определения гидропероксидов липидов в системе с люминолом и гемовыми белками (микропероксидазой, пероксидазой, гемоглобином) [12], железом(II) и кумарином [13] [14]. Однако в первом и во втором случаях аналитическим сигналом служит интенсивность медленной вспышки, которая, строго говоря определяется сложным комплексом реакций, следующих за окислением гидропероксидов. Железо(II) – менее специфичный и менее стабильный реагент на гидропероксиды, чем микропероксидаза.

Микропероксидаза представляет собой пептидный гемсодержащий фрагмент белка цитохрома С. Ранее показано [15], что при добавлении липидных гидропероксидов к системе микропероксидаза–изолюминол хемилюминесцентный сигнал не зависит от природы липида, а зависит только от его концентрации. Предложена [16] методика определения гидропероксидов липидов с микропероксидазой и люминолом, однако в качестве стандартного соединения использован *трет*-бутилгидропероксид, что неправомерно без соответствующей проверки.

Исходя из изложенного выше, нами поставлена задача разработки чувствительной, точной, экспрессной и недорогой методики определения общего количества гидропероксидов липидов в малых объемах биологических жидкостей для целей рутинного клинического анализа. Хемилюминесцентный метод выбран как высокочувствительный, недорогой, точный и относительно экспрессный. Из известных ХЛ-систем выбрана система на основе микропероксидазы и изолюминола. В качестве стандартных соединений использовали гидропероксид линолевой кислоты и *трет*-бутилгидропероксид как широко доступное соединение с низкой стоимостью.

Методику апробировали при анализе нового клинического материала – фолликулярной жидкости пациенток, проходящих процедуру экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), а также плазмы крови этих пациенток. Ранее окислительный стресс в липидном звене фолликулярной жидкости оценивали в нескольких работах общепринятым методом по маркеру окисления липидов – малоновому диальдегиду, который имеет ряд существенных недостатков [17, 18]. Определение липидных гидропероксидов в фолликулярной жидкости проведено впервые.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования, реагенты и аппаратура.

Для приготовления буферных растворов использовали KH_2PO_4 (Chemapol, ч. д. а.) и H_3BO_3 (Реахим, ч. д. а.), необходимое значение pH создавали добавлением растворов КОН или HCl (Chemapol,

ч. д. а.). Исходный раствор микропероксидазы-11 (MP-11) ($M_w = 1861.9$, Sigma) с концентрацией 100 мкМ готовили растворением навески в 20 мМ фосфатном буферном растворе с pH 7.4. Растворы микропероксидазы с концентрацией меньше 10^{-5} М готовили непосредственно перед экспериментом, так как они неустойчивы при хранении. Раствор 5 мМ изолюминола ($M_w = 195.2$, Aldrich) готовили растворением навески изолюминола в дистиллированной воде, подщелоченной КОН до pH 7.4. Использовали 70%-ный *трет*-бутилгидропероксид (tBuOOH) (MP Biomedicals), рабочие растворы готовили разбавлением фосфатным буферным раствором. Использовали раствор гидропероксида линолевой кислоты (ЛК-ООН) (13-HpODE, $M_w = 312.5$, Cayman Chemicals) в этаноле. Органические растворители и прочие реагенты, используемые в работе, имели квалификацию не ниже ч. д. а. (Sigma).

Хемилюминесценцию измеряли на хемилюминометре SmartLum-1200 (ДИСофт, Россия); pH – на pH-метре HANNA 201 (США). Пробирки с растворами при необходимости перемешивали на встряхивателе типа Vortex с частотой 1000 об/мин.

Использовали плазму крови и фолликулярную жидкость трех пациенток с бесплодием (Центр планирования семьи и репродукции, г. Москва).

Методика хемилюминесцентного эксперимента. В общем объеме 50.0 мл готовили ХЛ-реагент, содержащий микропероксидазу-11 и изолюминол в буферном растворе. После смешивания ХЛ-реагент оставляли на 20 мин и использовали в день приготовления.

В ХЛ-экспериментах 50 мкл раствора индивидуального гидропероксида в 50 мМ фосфатном буферном растворе с pH 7.4 помещали в кювету хемилюминометра, регистрировали спектр фонового раствора в течение 25 с, затем в кювету вводили 950 мкл ХЛ-реагента с помощью хроматографического шприца. Регистрировали ХЛ в течение 5 мин. Для каждого эксперимента проводили как минимум 3 параллельных измерения. В качестве аналитического сигнала использовали площадь под кривой хемилюминесценции (светосумму) за 5 мин после момента введения ХЛ-реагента, инициирующего хемилюминесцентную реакцию. В контрольных опытах вместо раствора гидропероксида в кювету вносили 50 мкл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 7.4. Введение гепарина и CaCl_2 не оказывало мешающего влияния.

Методика определения гидропероксидов липидов в липопротеинах плазмы крови и фолликулярной жидкости. Специальная методика выделения липопротеинов из фолликулярной жидкости отсутствует. Поскольку эта жидкость образуется в результате трансудации плазмы через капилляры теки, мы предложили использовать методику для выделения липопротеинов из плазмы крови

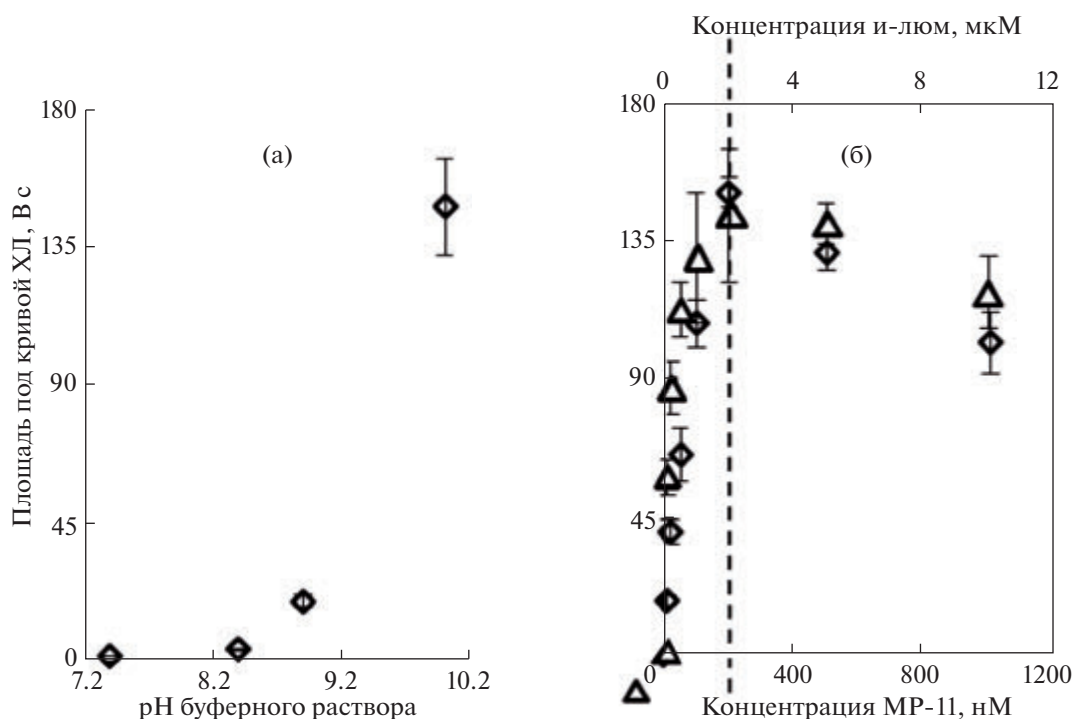


Рис. 1. Зависимости светосуммы ХЛ за 5 мин от рН буферного раствора (фосфатный для рН < 10 или боратный с рН 10.0, ХЛ-реагент содержал 200 нМ МР-11 и 2 мкМ изолюминола) (а) и концентраций изолюминола (Δ) или микропероксидазы (\diamond) (б). Концентрация *трет*-бутилгидропероксида 200 нМ, общий объем ХЛ-смеси 1000 мкл, $n = 3$.

[19]: 150 мкл плазмы помещали в пробирку, содержащую 1.5 мл 0.28%-ного раствора CaCl_2 и 30 мкл 1%-ного раствора кристаллического гепарина. Пробирку аккуратно встряхивали, оставляли при 4°C на 10 мин, затем центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин; супернатант отделяли и к полученному осадку добавляли 2.00 мл буферного раствора (50 мМ KH_2PO_4 с рН 7.4). Полученный раствор анализировали хемилюминесцентным методом без разбавления. Во время анализа образцы хранили на льду.

В кювету для хемилюминесценции помещали 50 мкл раствора липопротеинов, выделенных из плазмы крови или фолликулярной жидкости, затем вводили 950 мкл ХЛ-реагента и регистрировали кривые хемилюминесценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор условий проведения хемилюминесцентной реакции. Значение рН буферного раствора и концентрации реагентов (микропероксидазы-11 и изолюминола) подбирали с использованием 200 нМ раствора *трет*-бутилгидропероксида таким образом, чтобы аналитический сигнал был максимальным, расход реагентов минимальным и при этом микропероксидаза и изолюминол оставались в избытке по отношению к предполагаемому содержанию гидропероксидов (рис. 1).

Исследуемая ХЛ-система крайне чувствительна к рН реакционной среды. Данные, полученные при проведении реакции с использованием 2 мкМ изолюминола и 200 нМ микропероксидазы, представлены на рис. 1а. Наблюдаемый эффект усиления хемилюминесцентного сигнала с ростом рН связан с увеличением квантового выхода изолюминола, переходящего в щелочной среде в более активную депротонированную форму. Для дальнейших исследований использовали боратный буферный раствор с рН 10.0.

При увеличении концентрации изолюминола до 2 мкМ возрастает площадь под кривой ХЛ, в то время как при больших концентрациях хемилюминесцентный сигнал уменьшается (рис. 1б). Данный эффект, вероятно, связан с концентрационным тушением. Концентрация микропероксидазы влияет на хемилюминесценцию в системе аналогичным образом: аналитический сигнал максимален при 200 нМ, дальнейшее увеличение концентрации микропероксидазы не приводит к росту ХЛ-сигнала (рис. 1б).

Для дальнейших исследований выбрали следующие конечные концентрации: 2 мкМ изолюминола и 200 нМ микропероксидазы.

Выбор стандартного соединения для определения гидропероксидов липидов. В настоящее время нет единого стандартного соединения для определения липидных гидропероксидов. Общеприня-

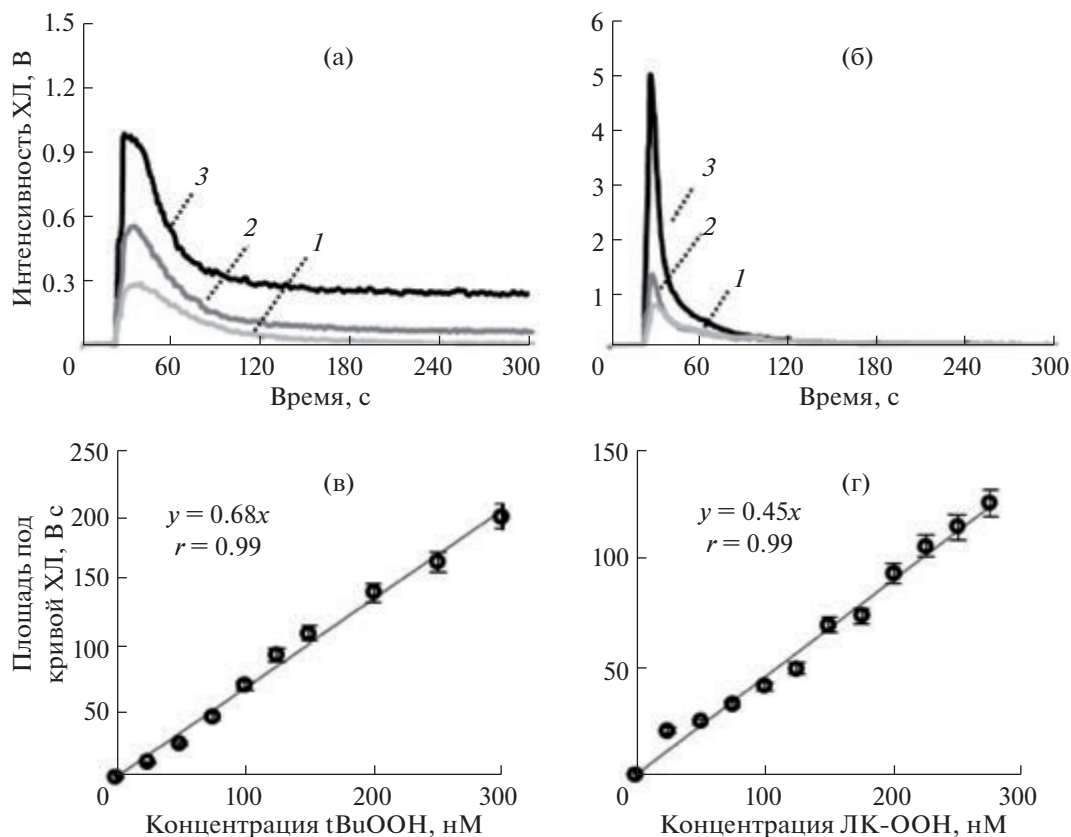


Рис. 2. Типичный вид ХЛ-кривых в системе, состоящей из 200 нМ МР-11, 2 мкМ изолюминола и различных количеств гидропероксидов, нМ: (а) – *трет*-бутилгидропероксида (1 – 25, 2 – 50 и 3 – 100) и (б) – гидропероксида линолевой кислоты (1 – 75, 2 – 100 и 3 – 200) в боратном буферном растворе с рН 10.0, и градуировочные зависимости площади под кривой ХЛ за 5 мин от концентрации *трет*-бутилгидропероксида (в) и гидропероксида линолевой кислоты (г). Общий объем ХЛ-смеси 1000 мкл; $n = 3$.

тый подход заключается в приготовлении частично окисленных липидов под действием УФ-облучения, свободно-радикального или ферментного окисления [20]. Таким образом, невозможно сравнить результаты, полученные разными исследователями. Приходится использовать в качестве стандартных индивидуальные соединения, в частности гидропероксид линолевой кислоты, которая является составной частью фосфолипидов и, наряду с арахидоновой кислотой, в первую очередь подвергается окислению. Коммерческие препараты чистых липидных гидропероксидов дороги, поэтому удобнее использовать дешевые и стабильные соединения, такие как *трет*-бутилгидропероксид.

Изменение концентрации tBuOOH в пределах от 25 до 300 нМ незначительно влияет на форму кривых хемилюминесценции, но приводит к увеличению максимальной интенсивности, а также уровня остаточной хемилюминесценции (рис. 2а). На этом участке зависимость площади под кривой ХЛ за 5 мин от концентрации tBuOOH линейна (рис. 2в), далее линейность зависимости нарушает-

ся из-за изменения формы регистрируемых кривых по мере увеличения концентрации tBuOOH.

Для ЛК-ООН градуировочная зависимость построена в том же концентрационном диапазоне, что и для tBuOOH, и также линейна (рис. 2г). Тем не менее кинетика протекающей хемилюминесцентной реакции, оцененная по форме ХЛ-кривых, в данном случае отличается от реакции с *трет*-бутилгидропероксидом (рис. 2б). Видно, что реакция с гидропероксидом линолевой кислоты протекает существенно быстрее. За исследуемый период времени (5 мин) реакция восстановления ЛК-ООН полностью заканчивается, что следует из уменьшения ХЛ-сигнала до фонового значения. В случае с tBuOOH ХЛ-реакция продолжается значительно дольше (рис. 2а и 2б соответственно).

Метрологические характеристики, рассчитанные для обоих стандартных соединений, приведены ниже:

tBuOOH: $y = (0.68 \pm 0.07)c$ (нМ) ($P = 0.99$, $n = 10$),
 $r = 0.99$, предел обнаружения 13 нМ;

ЛК-ООН: $y = (0.45 \pm 0.05)c$ (нМ) ($P = 0.99$, $n = 12$),

$r = 0.99$, предел обнаружения 16 нМ.

Градуировочные коэффициенты, рассчитанные для двух стандартных соединений согласно уравнениям линейных регрессий, различны и отличаются в $0.68/0.45 = 1.5$ раза. Это связано, очевидно, с отличиями в механизме взаимодействия, вытекающими из различий в кинетике процесса. Стоит также отметить, что форма ХЛ-кривых в случае гидропероксида линолевой кислоты совпадает с формой кривых, полученных для липопротеинов плазмы крови. Таким образом, *трет*-бутилгидропероксид не может быть использован в качестве стандартного соединения при определении липидных гидропероксидов ХЛ-методом.

Проверка правильности методики. Поскольку стандартных образцов липидных гидропероксидов не существует, и такие методы, как ИК-спектроскопия, титриметрия, спектрофотометрия непригодны в качестве альтернативных из-за недостаточной чувствительности, использовали способ введено–найдено. Определенные количества ЛК-ООН вводили в плазму крови. Результаты представлены в табл. 1.

Определение гидропероксидов липидов в липопротеинах крови и фолликулярной жидкости. Содержание гидропероксидов липидов в плазме здорового человека составляет 100–500 нМ в зависимости от исследования [8]. Анализировали три образца крови и фолликулярной жидкости. Определяли количество гидропероксидных групп методом градуировочного графика для ЛК-ООН. Результаты приведены в табл. 2.

Для апробации разработанной методики необходимо обследовать группу контроля и установить пределы референсных значений (границы содержаний анализов, в которые попадают 95% результатов анализа проб практически здоровых доноров). Для сыворотки крови это планируется выполнить в дальнейшем. Однако такое исследование фолликулярной жидкости нельзя провести по этическим причинам, поскольку забор материала от здоровых женщин невозможен. В связи с этим мы ограничились сравнением показателей фолликулярной жидкости и плазмы крови между собой, а также сопоставили их с исходом ЭКО. Оказалось, что концентрации липидных гидропероксидов в плазме и фолликулярной жидкости коррелируют между собой в случае удачного исхода ЭКО (пациентки № 1 и № 2). У пациентки № 3 повышена концентрация липидных гидропероксидов в фолликулярной жидкости (относительно плазмы крови); при этом из фолликулов не было получено яйцеклеток.

Разработанная методика определения липидных гидропероксидов ХЛ-методом в биологических жидкостях после пробоподготовки характеризуется достаточной чувствительностью (предел обнаружения 16 нМ), экспрессна (процедура ре-

Таблица 1. Проверка правильности методики способом введено–найдено (сигнал контрольного опыта вычтен) ($n = 3$, $P = 0.95$)

Введено ЛК-ООН, нМ	Найдено ЛК-ООН, нМ
50	49 ± 3
100	102 ± 6
300	297 ± 8

Таблица 2. Результаты (в единицах ЛК-ООН, нМ) определения гидропероксидов липидов в липопротеинах плазмы крови и фолликулярной жидкости пациенток, проходящих процедуру ЭКО ($n = 3$, $P = 0.95$)

Пациентка	Плазма крови	Фолликулярная жидкость
1	105 ± 6	110 ± 9
2	98 ± 5	102 ± 7
3	122 ± 6	920 ± 30

гистрации ХЛ-кривых занимает 5 мин, пробоподготовка – около 30 мин, обработка сигнала с оригинальным программным обеспечением PowerGraph – около 5 мин), проста в исполнении, требует малого объема пробы (150 мкл) и может быть рекомендована для клинических лабораторных исследований. В качестве стандартного соединения рекомендовано использовать коммерческий гидропероксид линолевой кислоты вместо часто применяемого *трет*-бутилгидропероксида. Методика может быть применена для определения гидропероксидов липидов в плазме или сыворотке крови и фолликулярной жидкости. Анализ образцов плазмы крови и фолликулярной жидкости трех пациенток с бесплодием, проходящих процедуру ЭКО показал, что в случае успешного созревания яйцеклетки уровень липидных гидропероксидов в фолликулярной жидкости соответствует таковому в плазме крови. Содержание липидных гидропероксидов в фолликулярной жидкости в случае пустого фолликула выше практически на порядок. В дальнейшем планируется проверить правильность методики с использованием хроматографического метода, расширить круг анализируемых биологических жидкостей, а также оценить уровень гидропероксидов в плазме крови представительной выборки практически здоровых доноров с целью последующего изучения различных нозологий.

Работа выполнена при поддержке средств гранта РФФ № 14-15-00375.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lushchak V.I., Gospodaryov D.V. Oxidative Stress and Diseases. Rijeka: InTech, 2012. 624 p.

2. *Li W.G., Stoll L.L., Rice J.B., Xu S.P., Miller Jr F.J., Chatterjee P., Hu L., Oberley L.W., Spector A.A., Weintraub N.L.* // *Free Rad. Biol. Med.* 2003. V. 34. P. 937.
3. *Miyamoto S., Di Mascio P.* // *Sub-Cell. Biochem.* 2014. V. 77. P. 3.
4. *Compton C.N., Franko A.P., Murray M.T., Diebel L.N., Dulchavsky S.A.* // *J. Trauma.* 1998. V. 44. P. 783.
5. *Berliner J.A., Heinecke J.W.* // *Free Rad. Biol. Med.* 1996. V. 20. P. 707.
6. *Zorn-Pauly K., Schaffer P., Pelzmann B., Bernhart E., Wei G., Lang P., Ledinski G., Greilberger J., Koidl B., Jurgens G.* // *Cardiovascular Res.* 2005. V. 66. P. 74.
7. *Asakawa T.M.* // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1978. V. 55. P. 619.
8. *Hara S., Totani Y.* // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1988. V. 65. P. 1948.
9. *Dobarganes M.C., Velasco J.* // *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 2002. V. 104. P. 420.
10. *Ma K., van de Voort F.R., Sedman J., Ismail A.A.* // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997. V. 74. P. 897.
11. *Yamaguchi Y., Kagota S., Kunitomo M., Haginaka J.* // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1999. V. 731. P. 223.
12. *Belghmi K., Nicolas J.C., Crastes de Paulet A.* // *J. Biol. Chemilum. Chemilum.* 1988. V. 2. P. 113.
13. *Driomina E., Polnikov I., Sharov V., Azizova O., Vladimirov Y.* // *Free Rad. Res.* 1994. V. 20. P. 279.
14. *Волкова П.О., Алексеев А.В., Джатдоева А.А., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А.* // *Вестн. Моск. Ун-та, сер. 2: Химия.* 2016. Т. 57. С. 34.
15. *Iwaoka T., Tabata F.* // *FEBS Lett.* 1984. V. 178. P. 47.
16. *Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В.* // *Вестн. РГМУ.* 2011. № 1. С. 54.
17. *Jana S.K., Chattopadhyay N.B., Chakravarty B., Chaudhury K.* // *Reproduct. Toxicol.* 2010. V. 29. P. 447.
18. *Pasqualotto E.B., Agarwal A., Sharma R.K., Izzo V.M., Pinotti J.A., Joshi N.J., Rose B.I.* // *Fertility Sterility.* 2004. V. 81. P. 973.
19. *Vladimirov Y.A., Sherstnev M.P.* // *Sov. Med. Rev. B. Physicochem. Asp. Med.* 1991. V. 2. P. 1.
20. *Ibusuki D., Nakagawa K., Asai A., Oikawa S., Masuda Y., Suzuki T., Miyazawa T.* // *J. Lipid Res.* 2008. V. 49. P. 2668.