

Л.В. Натяганова¹, О.А. Гаврилова², Л.Р. Колесникова¹**ОЦЕНКА СИСТЕМЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ – АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ
У ДЕТЕЙ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ МЕТОДАМИ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ**¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

В статье представлены результаты исследования некоторых показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты (ПОЛ-АОЗ) у детей в возрасте 11–13 лет с эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ), полученные методами спектрофотометрии и хемилюминесценции. Количество продуктов ПОЛ-АОЗ в сыворотке крови пациентов с ЭАГ значительно превышает аналогичные показатели группы контроля. Интенсивность процессов ПОЛ, выраженная показателями хемилюминесценции, у пациентов с ЭАГ также была выше контрольной.

Ключевые слова: дети, пероксидация липидов, антиоксидантная защита

**ASSESSMENT OF THE SYSTEM OF LIPID PEROXIDATION – ANTIOXIDANT DEFENSE
IN CHILDREN WITH ESSENTIAL ARTERIAL HYPERTENSION BY THE METHODS OF
SPECTROPHOTOMETRY AND CHEMILUMINESCENCE**L.V. Natyaganova¹, O.A. Gavrilova², L.R. Kolesnikova¹¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

The article presents the results of the research of some indices of lipid peroxidation and antioxidant defense in children of 11–13 years with essential arterial hypertension that were obtained by the methods of spectrophotometry and chemiluminescence. Quantity of products of lipid peroxidation – antioxidant defense in blood serum of patients with essential arterial hypertension significantly exceeds this index in control group. Intensity of the lipid peroxidation processes expressed by the indices of chemiluminescence was higher in patients with essential arterial hypertension than in control group.

Key words: children, lipid peroxidation, antioxidant defense

Одна из ключевых задач лабораторного контроля – выявление начальных, обратимых, стадий патологического состояния для разработки патогенетически обоснованной тактики лечения. Свободнорадикальное окисление (СРО) является важной составляющей частью метаболизма. Его роль в развитии различных патологических процессов не вызывает сомнения [1, 4, 8, 9, 10, 13]. Во многих случаях изменения СРО регистрируются раньше проявления симптомов заболевания, и все активнее изучение его показателей используется для назначения и оценки результатов антиоксидантной коррекции в комплексной терапии [7]. В настоящее время окислительный стресс рассматривается как один из начальных механизмов в развитии ряда патологических состояний, в том числе и при эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) [1, 7, 8, 13].

Реакции ПОЛ отличаются большой сложностью и включают в себя целый ряд быстро протекающих стадий. Спектрофотометрические и флуориметрические методы позволяют оценить количественное содержание продуктов ПОЛ и компонентов АОЗ в изучаемой среде. Основные участники реакции, свободные радикалы, не могут быть определены обычными методами химического анализа из-за своей крайне высокой реакционной способности и неустойчивости в биологических системах. Поэтому регистрация интенсивности свечения в режиме реального времени представляет собой ценную информацию для анализа кинетики

реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ). Индуцированная хемилюминесценция сыворотки крови, по мнению большинства исследователей, является наиболее объективным и информативным методом изучения процесса ПОЛ-АОЗ в биологических жидкостях [5, 11], хотя пока спектрометрические методы преобладают как в клинических лабораторных, так и в научных биохимических исследованиях ПОЛ-АОЗ.

Целью исследования было выявление наличия окислительного стресса у пациентов с ЭАГ методами спектрофотометрии и хемилюминесценции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе клиники Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск) проведено клиничко-функциональное обследование 58 детей в возрасте 11–13 лет, из них 30 – с синдромом эссенциальной артериальной гипертензии. Забор крови проводили из локтевой вены, натощак, с 8 до 9 часов утра, в соответствии с общепринятыми требованиями. О состоянии процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы судили по изменению содержания в плазме крови следующих показателей: субстратов с сопряженными ненасыщенными двойными связями (Дв. св.), диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов и сопряженных триенов (КД – СТ) [2], малонового диальдегида

(МДА) [3], активности супероксиддисмутазы (СОД) [14], общей антиокислительной активности (АОА) крови [6], α -токоферола и ретинола [12], а также по показателям, полученным методом индуцированной хемилюминесценции – амплитуде быстрой вспышки ($\max_{\text{сыв.}}$) и светосумме свечения ($S_{\text{сыв.}}$). Для изучения хемилюминесценции использовали сыворотку крови. Показатели хемилюминесценции регистрировали на биохемилюминометре SmartLum-5773. В измерительную кювету вносили 800 мкл буферного раствора ($\text{pH} = 7,4$), 200 мкл сыворотки, 800 мкл раствора железа в концентрации 0,14 %, 50 мкл 3%-й перекиси водорода, помещали в измерительную камеру прибора и регистрировали хемилюминесценцию в течение 3 минут. Регистрацию кинетики хемилюминесценции производили с помощью программного обеспечения PowerGraph 3.3 на персональном компьютере.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

У всех обследованных пациентов средние показатели содержания Дв. св. в крови ниже, чем в контроле, на 38,7 % ($p = 0,00$), что позволяет сделать вывод о высокой степени окисления субстратов на первых этапах процессов липопероксидации. Эти данные хорошо согласуются со статистически значимым снижением активности СОД. Уровень промежуточных продуктов (КД – СТ) в крови детей с гипертензией, напротив, на 42,5 % ($p = 0,00$) выше контрольных показателей. Содержание МДА у пациентов с ЭАГ также достоверно ($p = 0,01$) выше, чем в контрольной группе – на 35,4 % (табл. 1). Эти результаты убедительно подтверждают дальнейшую активацию процессов пероксидации липидов у детей с ЭАГ. В то же время у пациентов с артериальной гипертензией общая АОА крови выше на 34,6 % ($p = 0,01$). Этот показатель характеризует суммарную активность

ингибиторов радикального окисления и определяет ее буферную емкость, включая большое количество антиоксидантов различной природы. Обычно рассматривают основные звенья АОЗ – ферментативное – СОД и низкомолекулярные жирорастворимые витамины (α -токоферол, ретинол). Активность СОД у пациентов также выше, чем у здоровых детей, на 13,0 % ($p = 0,00$). Известно, что первой реакцией антиоксидантной защиты в условиях патологического процесса является повышение активности компонентов ферментативного звена, а при длительном воздействии повреждающих факторов происходит их перерасход. Снижение концентрации α -токоферола в крови пациентов, по сравнению с контролем, можно объяснить расходом его на дальнейших стадиях СРО и принять как доказательство нарастания напряжения в системе АОЗ. Исследование корреляционных связей в группе с эссенциальной артериальной гипертензией выявило статистически значимые сильные отрицательные взаимодействия между показателями ретинол – АОА ($r = 0,69$). Это может свидетельствовать о значительном вкладе ретинола в функционирование системы антиоксидантной защиты.

В исследовании методом хемилюминесценции были проанализированы два параметра кривой хемилюминесценции. Светосумма свечения ($S_{\text{сыв.}}$) – площадь под кривой от начала нарастания амплитуды медленной вспышки до достижения ею максимума – отражает способность системы подвергаться процессам окисления. Среднее значение площади под кривой хемилюминесценции сыворотки крови в группе с ЭАГ выше на 28,5 %, чем в контроле ($p = 0,02$). Амплитуда быстрой вспышки ($\max_{\text{сыв.}}$) пропорциональна исходному содержанию гидроперекисей в пробе. Среднее значение максимума хемилюминесценции сыворотке крови в группе с ЭАГ на 55,8 % выше ($p = 0,02$), чем в контроле (табл. 2).

Таблица 1
Некоторые показатели процессов липопероксидации в крови у детей контрольной группы и пациентов с ЭАГ

Показатели	Контроль ($n = 28$)	ЭАГ ($n = 30$)	p_t
	$M \pm s$	$M \pm s$	
Субстраты с Дв. св. (усл. ед.)	$1,78 \pm 0,61$	$1,09 \pm 0,34$	0,00
КД – СТ (усл. ед.)	$0,54 \pm 0,38$	$0,94 \pm 0,44$	0,00
МДА (мкмоль/л)	$0,98 \pm 0,23$	$1,11 \pm 0,42$	0,01
$S_{\text{сыв.}}$ (усл. ед.)	$145,68 \pm 42,38$	$187,21 \pm 60,33$	0,02

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольным показателям.

Таблица 2
Некоторые показатели антиоксидантной системы у детей контрольной группы и пациентов с ЭАГ

Показатели	Контроль ($n = 28$)	ЭАГ ($n = 30$)	p_t
	$M \pm s$	$M \pm s$	
АОА (усл. ед.)	$11,71 \pm 3,93$	$15,76 \pm 5,91$	0,01
СОД (усл. ед.)	$1,61 \pm 0,19$	$1,82 \pm 0,07$	0,00
α -токоферол	$8,18 \pm 2,32$	$5,46 \pm 1,14$	0,03
$\max_{\text{сыв.}}$ (усл. ед.)	$2,28 \pm 0,38$	$3,21 \pm 0,88$	0,02

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольным показателям.

ВЫВОДЫ

Определение количественных показателей продуктов ПОЛ-АОЗ в сыворотке крови пациентов с ЭАГ методом спектрофотометрии достоверно доказало их превышение над аналогичными показателями группы контроля. Интенсивность процессов липопероксидации и их торможения, выраженная светосуммой свечения и максимумом хемилюминесценции, также выше у пациентов с ЭАГ, в сравнении с группой контроля. Оба метода позволяют регистрировать наличие окислительного стресса у пациентов в условиях патологии.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Владимир Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросов. Образов. журн. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13–19.
2. Vladimirov Yu.A. Free radicals in biological systems // Sorosov. Obrazov. zhurn. – 2000. – Vol. 6, N 12. – P. 13–19. (in Russian)
3. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопр. мед. химии. – 1989. – № 1. – С. 127–131.
4. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G. Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol blood extracts // Vopr. med. himii. – 1989. – N 1. – P. 127–131. (in Russian)
5. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопр. мед. химии. – 1987. – № 1. – С. 118–122.
6. Gavrilo V.B., Gavrilova A.R., Mazhul L.M. Analysis of the methods of determination of lipid peroxidation products in blood serum by the test with thiobarbituric acid // Vopr. med. himii. – 1987. – N 1. – P. 118–122. (in Russian)
7. Гусева О.Е., Лебедев О.А., Козлов В.К. Возрастные особенности хемилюминесценции цельной крови у детей с хроническими воспалительными заболеваниями легких на фоне дефектов органогенеза респираторной системы // Дальневосточный медицинский журнал. – 2009. – № 4. – С. 74–77.
8. Guseva O.E., Lebedko O.A., Kozlov V.K. Age peculiarities of chemiluminescence of whole blood in children with chronic inflammatory lung diseases associated with defects of organogenesis of respiratory system // Dal'nevostochnyj medicinskij zhurnal. – 2009. – N 4. – P. 74–77. (in Russian)
9. Камилов Р.Ф. и др. Хемилюминесценция как метод оценки общей антиокислительной активности крови, слюны, слезной жидкости и мочи // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – № 2. – С. 21–22.
10. Kamilov R.F. et al. Chemiluminescence as a method of assessment of total antioxidant activity of blood, saliva lachrymal fluid and urine // Klinicheskaja laboratornaja diagnostika. – 2009. – N 2. – P. 21–22. (in Russian)
11. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. Оценка АОО плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лаб. дело. – 1988. – № 5. – С. 59–60.
12. Klebanov G.I., Babenkova I.V., Teselkin Yu.O. Assessment of antioxidant activity of blood plasma using vitelline lipoproteins // Lab. delo. – 1988. – N 5. – P. 59–60. (in Russian)
13. Колесникова Л.И., Долгих В.В., Леонтьева И.В., Бугун О.В. Эссенциальная артериальная гипертензия у детей и подростков: клинико-функциональные варианты. – Иркутск, 2008. – 180 с.
14. Kolesnikova L.I., Dolgikh V.V., Leontjeva I.V., Bugun O.V. Essential arterial hypertension in children and adolescents: clinical-functional variants. – Irkutsk, 2008. – 180 p. (in Russian)
15. Колесникова Л.И., Долгих В.В., Натяганова Л.В. и др. Окислительный стресс у детей подростков с лабильной артериальной гипертензией // Сиб. мед. журнал. – 2009. – Т. 24, № 3. – С. 25–27.
16. Kolesnikova L.I., Dolgikh V.V., Natyaganova L.V. et al. Oxidative stress in children and adolescents with labile arterial hypertension // Sib. med. zhurnal. – 2009. – Vol. 24, N 3. – P. 25–27. (in Russian)
17. Колесникова Л.И. и др. Особенности перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты у мальчиков-подростков Иркутска // Репродуктивное здоровье детей и подростков. – 2009. – Т. 28, № 5. – С. 63–67.
18. Kolesnikova L.I. et al. Peculiarities of lipid peroxidation – antioxidant defense in adolescent boys living in Irkutsk // Reproaktivnoe zdorov'e detej i podrostkov. – 2009. – Vol. 28, N 5. – P. 63–67. (in Russian)
19. Колесникова Л.И. и др. Особенности процессов перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты у подростков проживающих в городе Ангарске // Известия Самарского научного центра РАН. – 2009. – Т. 11, № 1-5. – С. 877–879.
20. Kolesnikova L.I. et al. Peculiarities of processes of lipid peroxidation – antioxidant defense in adolescents living in Angarsk // Izvestija Samarskogo nauchnogo centra RAN. – 2009. – Vol. 11, N 1-5. – P. 877–879. (in Russian)
21. Семенюк А.В., Колесникова Л.И., Куликов В.Ю., Неделькина С.В. и др. Метод оценки активности ферментов метаболизма лекарственных соединений // Клиническая лабораторная диагностика. – 1982. – № 10. – С. 607–609.
22. Semenyuk A.V., Kolesnikova L.I., Kulikov V.Yu., Nedelkina S.V. et al. Method of assessment of activity of drug metabolism enzymes // Klinicheskaja laboratornaja diagnostika. – 1982. – N 10. – P. 607–609. (in Russian)
23. Черняускене Р.Ч., Варшкявичене З.З., Грибаускас П.С. Одновременное определение концентраций витаминов Е и А в сыворотке крови // Лаб. дело. – 1984. – № 6. – С. 362–365.
24. Chernyuskene R.Ch., Varshkyavichene Z.Z., Gribauskas P.S. Simultaneous determination of vitamins E and A in blood serum // Lab. delo. – 1984. – N 6. – P. 362–365. (in Russian)

13. Kolesnikova L.I., Madaeva I.M., Semenova N.V., Vlasov B.Ya. et al. Antioxidant potential of the blood in men with obstructive sleep breathing disorders // Bull. of Experim. Biology and Medicine. – 2013. – Vol. 154, N 6. – P. 731–733.

14. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // J. Biol. Chem. – 1972. – Vol. 247. – P. 3170–3175.

Сведения об авторах

Натяганова Лариса Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патофизиологии и репродукции человека Научного центра проблем семьи и репродукции человека (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: 8 (3952) 20-73-67; e-mail: irklara@yandex.ru)

Гаврилова Оксана Александровна – интерн кафедры клинической лабораторной диагностики Иркутского государственного медицинского университета (e-mail: Oksana.gavrilova.91@mail.ru)

Колесникова Лариса Романовна – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории проблем общественного здоровья Научного центра проблем семьи и репродукции человека (e-mail: l.kolesnikova2010@yandex.ru)

Information about the authors

Natyaganova Larisa Viktorovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of the Laboratory of Human Pathophysiology Reproduction of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str., 16, Irkutsk, 664003; tel.: +7 (3952) 20-73-67; e-mail: irklara@yandex.ru)

Gavrilova Oksana Aleksandrovna – Resident of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Irkutsk State Medical University (e-mail: Oksana.gavrilova.91@mail.ru)

Kolesnikova Larisa Romanovna – Candidate of Medical Sciences, Junior Research Officer of the laboratory of Public Health Problems of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: l.kolesnikova2010@yandex.ru)