

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.24-07:616.153.11-073.56

Сапожникова М.А., Страхова Л.А., Блинова Т.В., Макаров И.А., Рахманов Р.С., Умнягина И.А.

## ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И АНТИОКСИДАНТНОЙ СПОСОБНОСТИ СЫВОРОТКИ

ФБУН «Нижегородский НИИ гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора, 603950, г. Нижний Новгород, Россия

*Проведен анализ показателей окислительного статуса и антиокислительной способности сыворотки, полученных колориметрическим методом, основанным на определении пероксидов в сыворотке крови у обследованных разных категорий: здоровых в возрасте от 17 до 20 лет, от 30 до 60 лет и больных с бронхолегочной патологией. Низкий уровень окислительного стресса и высокая антиоксидантная способность сыворотки были выявлены у лиц молодого возраста. С увеличением возраста степень выраженности окислительного стресса увеличивалась, а уровень антиоксидантной защиты снижился. Почти у всех больных с бронхолегочной патологией наблюдался высокий уровень окислительного стресса и низкий антиоксидантной защиты. При анализе количественных данных изученных показателей выявлена их адекватность состоянию здоровья.*

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** окислительный стресс; антиоксидантная способность; здоровые; больные с бронхолегочной патологией.

**Для цитирования:** Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(10): 25–27.

*Sapojnikova M.A., Strakhova L.A., Blinova T.V., Makarov I.A., Rakhmanov R.S., Umniagina I.A.*

THE POSSIBILITY OF APPLICATION OF COLORIMETRY TECHNIQUE OF DETECTION OF LEVELS OF OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF SERUM

The Nijegorodskii research institute of hygiene and occupational pathology of Rospotrebnadzor, 603950 Nizhny Novgorod, Russia

*The analysis was implemented concerning indicators of oxidative status and antioxidant capacity of serum. The indicators were received by colorimetry technique based on detection of peroxides in blood serum in examined patients of different categories: healthy persons aged from 17 to 20 years and from 30 to 60 years and patients with bronchopulmonary pathology. The low level of oxidative stress and high antioxidant capacity of serum were established in individuals of younger age. With increasing of age, degree of expression of oxidative stress augmented and level of antioxidant defense lowered. Almost all patients with bronchopulmonary pathology had high level of oxidative stress and low level of antioxidant defense. The analysis of quantitative data of examined indicators their conformity with health condition was established.*

**Key words:** oxidative stress; antioxidant capacity; healthy person; patient; bronchopulmonary pathology

**Citation:** *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (11): 25–27. (in Russ.)*

**Введение.** К настоящему времени, несмотря на многочисленные исследования, касающиеся роли системы окислителей–антиоксидантов в развитии физиологических и патологических процессов в организме, интерес исследователей к данным системам не угасает, напротив, еще более усиливается [4, 9]. Установлено, что высокий окислительный стресс при сниженной антиоксидантной защите является патогенетическим звеном в развитии многих заболеваний, таких как рак, диабет, сердечно-сосудистые, неврологические, легочные и различные профессиональные заболевания [5, 9, 10]. Являясь неспецифическими показателями, маркеры окислительного стресса и антиоксидантной защиты не используются в качестве диагностических критериев. Тем не менее данные показатели могут служить информативными тестами для оценки тяжести течения заболевания, его прогноза, эффективности лечения и проведения профилактических мероприятий [7]. Антиоксиданты могут являться перспективными препаратами для лечения многих заболеваний [6]. На основании изложенного можно сделать заключение о необходимости более широкого внедрения методов оценки состояния системы свободнорадикального окисления в перечень научных и практических исследований. Предложенные методы определения маркеров окислительного стресса (4-гидроксиалкенов, нитротирозина, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, восстанов-

ленного и окисленного глутатиона, изопростаноидов, малонового диальдегида – МДА), такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, масс-спектрометрия, люминолзависимая хемилюминесценция, иммуноферментный анализ сложны и малодоступны практике [3]. Для оценки состояния антиоксидантной защиты предложено определение ряда показателей – активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, пероксиредоксина, тиоредоксина, витаминов Е и С. Определение отдельных компонентов антиоксидантной защиты, безусловно, более информативно и важно для проведения углубленных исследований [2]. Однако для мониторинга за состоянием системы окислителей–антиоксидантов целесообразно применять количественные методы интегрального определения свободных радикалов и антиоксидантной защиты [1]. В последние годы для оценки уровня окислительного стресса и антиоксидантной защиты применяются колориметрические методы, основанные на измерении пероксидов в сыворотке крови [6, 8]. Имеются как автоматизированные методы, приспособленные для специальных автоматических анализаторов, так и ручные с использованием специальных наборов реагентов.

Цель исследования – проанализировать показатели уровня окислительного стресса и антиоксидантной защиты, полученные с помощью колориметрического метода определения пероксидов в сыворотке крови у лиц разных категорий.

**Материалы и методы.** Для количественной оценки состояния общего окислительного статуса/окислительного стресса и общей антиокислительной способности сыворотки были использованы наборы реагентов PerOx (TOS/TOC) Kit

Для корреспонденции: *Блинова Татьяна Владимировна*,  
btvdn@yandex.ru

For correspondence: *Blinova T.V.*, btvdn@yandex.ru

Таблица 1

**Показатели оксидативного стресса и общей антиоксидантной способности сыворотки у обследованных**

Показатель	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	I	II	I	II	I	II
Уровень оксидативного стресса:						
высокий	0	0	46,5	591,7 ± 254,2	90	728,0 ± 280,0
					<i>p**</i> = 0,000	
средний	16,7	224,0 ± 21,2	28,7	258,6 ± 40,4	10	260,4 ± 43,2
				<i>p*</i> = 0,000	<i>p**</i> = 0,6	
низкий	83,3	99,1 ± 41,0	24,8	134,0 ± 54,7	0	0
				<i>p*</i> = 0,000		
Антиоксидантная способность:						
высокая	52,1	337,5 ± 13,9	19,8	351,0 ± 26,2	6,2	361,0 ± 37,4
				<i>p*</i> = 0,000	<i>p**</i> = 0,002	
средняя	49,7	307,8 ± 12,3	44,5	294,8 ± 10,1	18,1	296,1 ± 11,3
				<i>p*</i> = 0,000	<i>p**</i> = 0,6	
низкая	0		44,5	250,5 ± 20,5	75,7	206,0 ± 31,5
					<i>p**</i> = 0,001	

Примечание. Здесь и в табл.2: I – частота выявления, %; II – величина показателя ( $M \pm \sigma$ ), мкмоль/л; *p\** – достоверность показателей группы 2 относительно группы 1; *p\*\** – достоверность показателей группы 3 относительно группы 2.

и ImAnOx(TAS/TAC) Kit фирмы Immundiagnostik (Германия). Данные наборы основаны на простых колориметрических микропланшетных методах количественного определения пероксидов в сыворотке крови с использованием пероксидазы и тетраметилбензидина. Построения калибровочной кривой не требуется. Полученные результаты рассчитывают по стандарту. Для количественной оценки степени выраженности окислительного стресса и антиоксидантной защиты нами использовались показатели, рекомендованные производителями наборов: менее 180 мкмоль/л пероксидов в сыворотке – низкий окислительный стресс, 180 – 310 мкмоль/л – средний, более 310 мкмоль/л – высокий окислительный стресс; менее 280 мкмоль/л разложившейся экзогенной перекиси – низкая антиоксидантная способность, 280–320 мкмоль/л – средняя и более 320 мкмоль/л – высокая антиоксидантная способность. Для оценки адекватности степени повреждения систем свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты с помощью перечисленных выше показателей последние сравнивали с содержанием в сыворотке крови МДА, которое определяли колориметрическим методом с тиобарбитуровой кислотой [11]. При обработке полученных данных вычисляли среднюю арифметическую ( $\bar{X}$ ) и среднее квадратическое отклонение ( $SD$ ). Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. Значимыми считали различия при доверительном интервале 95% ( $p \leq 0,05$ ). Для установления связи между признаками высчитывали коэффициент корреляции ( $r$ ). Обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы Statistika 6.

Были обследованы три группы лиц: 49 здоровых в возрасте

18,5 ± 2,1 года (группа 1), 112 здоровых в возрасте 45 ± 15,2 года (группа 2), 72 больных с профессиональной бронхолегочной патологией в возрасте 60 ± 10,5 года (группа 3). Больные находились на лечении в клинике ФБУН ННИИГП Роспотребнадзора, здоровые лица проходили диспансеризацию в поликлиническом отделении ННИИГП. Кровь для исследования забиралась утром натощак.

**Результаты и обсуждение.** Показатели оксидативного стресса и антиоксидантной способности сыворотки крови у разных групп обследованных приведены в табл. 1.

Установлена четкая зависимость частоты выявления оксидативного стресса разного уровня и общей антиокислительной способности сыворотки и величины этих показателей от возраста и состояния здоровья обследуемых. У здоровых молодого возраста выявлен низкий и средний уровень оксидативного стресса, причем у большей части (83,3%) обследованных преобладал низкий уровень оксидативного стресса. Выявляемое наименьшее количество пероксидов в сыворотке крови составляло 40–50 мкмоль/л. Высокого уровня окислительного стресса не наблюдалось. Среди лиц более старшего возраста доля с высоким уровнем оксидативного стресса увеличивалась, а число лиц с низким уровнем стресса уменьшалось. При этом наименьшее количество пероксидов у данной категории лиц пре-

вышало в 1,5–2 раза их значения у лиц молодого возраста и составляло 80–100 мкмоль/л. Величина, характеризующая высокий уровень оксидативного стресса, достаточно велика у данной категории лиц и колебалась от 590 до 845 мкмоль/л. Почти у всех больных с бронхолегочной патологией выявлен высокий уровень оксидативного стресса, превысивший его значение у здоровых. Из них у 15% обследованных количество пероксидов в сыворотке крови достигало 780–1380 мкмоль/л. Низкий уровень оксидативного стресса не выявлялся.

Анализ общей антиокислительной активности сыворотки показал, что у здоровых лиц молодого возраста в равной степени преобладала высокая и средней степени выраженности антиокислительная активность. С возрастом доля лиц с высокой антиокислительной активностью снижалась, возрастало число лиц с низким уровнем антиокислительной активности. Почти у половины обследованных антиокислительная активность находилась на среднем уровне. У больных с бронхолегочной патологией (группа 3) уровень антиокислительной активности существенно отличался от ее уровня в группах 1 и 2. У большей части больных отмечался низкий уровень антиокислительной активности сыворотки. Высокая анти-

Таблица 2

**Частота отклонений концентрации МДА и его содержание в сыворотке крови у обследованных**

Концентрация МДА	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	I	II	I	II	I	II
Нормальная	75,8	0,8 ± 0,24	50	1,3 ± 0,28	20	1,5 ± 0,31
Выше нормы	24,2	2,1 ± 0,33	50	2,2 ± 0,36	80	2,9 ± 0,78
Средняя величина (1,4 ± 0,4 мкмоль/л)	1,16 ± 0,6		1,74 ± 0,56		2,67 ± 0,89	
			<i>p*</i> = 0,000		<i>p**</i> = 0,000	

оксидантная способность была выявлена лишь у 6% обследованных. Выявлена обратная коррелятивная связь между показателями окислительной и антиокислительной активности сыворотки у здоровых лиц молодого возраста ( $r = -0,35$ ;  $p=0,017$ ), старшего возраста ( $r = -0,45$ ;  $p=0,008$ ) и у больных с бронхолегочной патологией ( $r = -0,6$ ;  $p=0,001$ ), что является важным для общей оценки состояния системы оксидантов – антиоксидантов.

Показатели МДА у обследованных представлены в табл. 2.

Анализ содержания МДА показал, что у большей части здоровых лиц молодого возраста оно было в пределах нормы. Однако у 24,2% оно выявлена его повышенная концентрация. Среди обследованных более старшего возраста доля лиц с повышенным содержанием МДА увеличилась на 39,3%. Как правило, в обеих группах это были лица с высоким и средним уровнем оксидативного стресса. У основной части больных с хронической бронхолегочной патологией концентрация МДА в сыворотке крови была высокой, превышающей норму в 2–3 раза и достигающей у некоторых лиц 4,5–6,1 мкмоль/л. У этих больных выявлен высокий уровень оксидативного стресса.

**Заключение.** Основываясь на полученных нами результатах, можно полагать, что используемые в работе колориметрические методы интегральной оценки окислительного стресса и антиоксидантной защиты и градация их уровня (высокий, средний, низкий), основанная на количественной характеристике, вполне адекватно отражают степень их выраженности в зависимости от физиологического и патологического состояния организма. Полученные данные подтверждают результаты выявления МДА, определение которого широко используется для оценки окислительного стресса. Колориметрические методы определения уровня окислительного стресса и антиоксидантной защиты, основанные на измерении пероксидов, просты в исполнении, не требуют длительного времени для получения результатов и могут быть рекомендованы в клинической практике, профилактической медицине, в оздоровительных центрах, при профилактических осмотрах, для мониторинга образа жизни и режима питания населения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Епифанцева Н.Н., Борщикова Т.И., Чурляев Ю.А., Ситников П.Г., Никифорова Н.В., Екимовских А.В. и др. Интегральная оценка оксидантно-антиоксидантного статуса у больных отделения нейрореанимации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 11: 31–5.
2. Колесникова Л.И., Мадаева И.М., Семенова Н.В., Гребенкина Л.А., Солодова Е.И. Оценка окислительного стресса у женщин с нарушениями сна в постменопаузе с использованием интегрального показателя. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 13: 29–32.
3. Морозов Ю.А., Дементьева И.И., Палюлина М.В. Лабораторная оценка оксидативного стресса и антиоксидантной защиты. *Справочник заведующего КДЛ*. 2014; 3: 49–62.
4. Рахманов Р.С., Блинова Т.В., Тарасов А.В., Шумских Д.С. Антиоксидантная система как показатель оценки состояния и прогнозирования здоровья населения. *Гигиена и санитария*. 2014; 6 (93): 91–4.
5. Соадаева С.К. Свободнорадикальные механизмы повреждения при болезни органов дыхания. *Пульмонология*. 2012; 1: 5–10.

6. Erel Ozcan. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*. 2005 (12 December); vol. 38: 1103–11.
7. Huige L., Ning X., Ulric F. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide*. 2012 (2 February 15); vol. 26: 102–10.
8. Neyal M., Yimenicioglu F., Aydeniz A., Taskin A., Saglam S., Cekmen M. et al. Plasma nitrite levels, total antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index in patients with tension-type headache and fibromyalgia. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2013 (6 June); vol. 115: 736–40.
9. Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*. 2010 (11 December 1); vol. 49: 1603–16.
10. Martin R.D., Eleanor K.C., John W.M. et al. Oxidative damage to extra cellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008 (12 June 15); vol. 44: 1973–2001.
11. Ushiyama M. Determination of malonaldehyd precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem*. 1978; vol. 86; 1: 271–8.

Поступила 16.03.15

#### REFERENCES

1. Epifantseva N.N., Borshchikova T.I., Churlyayev Yu.A., Sitnikov P.G., Nikiforova N.V., Ekimovskikh A.V. i dr. Integral evaluation of oxidant-antioxidant status in patients of neuroresuscitation department. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 11: 31–5. (in Russian)
2. Kolesnikova L.I., Madaeva I.M., Semenova N.V., Grebenkina L.A., Solodova E.I. Evaluation (by integral index) of oxidative stress in postmenopausal women with sleep disorders. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 13: 29–32. (in Russian)
3. Morozov Yu.A., Dement'eva I.I., Palyulina M.V. Laboratory evaluation of oxidative stress and antioxidant defense. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2014; 3: 49–62. (in Russian)
4. Rakhmanov R.S., Blinova T.V., Tarasov A.V., Shumskikh D.S. Antioxidant system as evaluation index of status and prediction of population health. *Gigiena i sanitariya*. 2014; 6 (93): 91–4. (in Russian)
5. Soadaeva S.K. Free radical mechanisms of damage in respiratory diseases. *Pul'monologiya*. 2012; 1: 5–10. (in Russian)
6. Erel, Ozcan. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*. 2005 (12 December); vol. 38: 1103–11.
7. Huige L., Ning X., Ulric F. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide*. 2012 (2 February 15); vol. 26: 102–10.
8. Neyal M., Yimenicioglu F., Aydeniz A., Taskin A., Saglam S., Cekmen M. et al. Plasma nitrite levels, total antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index in patients with tension-type headache and fibromyalgia. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2013 (6 June); vol. 115: 736–40.
9. Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*. 2010 (11 December 1); vol. 49: 1603–16.
10. Martin R.D., Eleanor K.C., John W.M. et al. Oxidative damage to extra cellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008 (12 June 15); vol. 44: 1973–2001.
11. Ushiyama M. Determination of malonaldehyd precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem*. 1978; vol. 86; 1: 271–8.

Received 16.03.15