

Примечание:

1. Для облучения сред УЗ берут взвесь эритроцитов 0,01 по количеству клеток в 1 мл от исходной, объем среды подвергаемой облучению 5 мл; для облучения белка УЗ берут концентрации 10^{-4} – 10^{-5} М/мл

Обработка сред УЗ происходит следующим образом. УЗ излучатель терапевтического аппарата опускают сверху в облучиваемые среды на 5 мл в погруженное положение. Облучаемые среды находятся в стеклянном сосуде, который охлаждается проточной водой от термостата. Облученные пробы исследовались по методикам описанным ниже.

2. В случае воздействия на исследуемые объекты УФ, облучаемые среды находились в стеклянных сосудах охлаждаемых проточной водой от термостата и закрытые сверху кварцевыми стеклами, через которые происходило воздействие УФ. Между кварцевым стеклом и излучателем УФ находился кварцевый сосуд через который протекала вода для поглощения теплового, инфракрасного излучения лампы.

3. При использовании ионов переменной валентности в исследуемые среды растворял металлы (в присутствии ЭДТА) в концентрациях от 1 до 2-х порядков больше чем концентрация исследуемых проб и пероксид водорода в концентрации на 2–3 порядка больше, чем концентрация металла.

Пробы на которые воздействовали различным способом, иницируя образование свободных радикалов, исследовались по методикам описанным ниже.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Аркачев // Наука. — 1972. — С. 272.
2. Курашвили, Л. В. Современное представление о перекисном окислении липидов и антиоксидантной системе при патологических состояниях: метод. пособие / Л. В. Курашвили, Г. А. Косой, И. Р. Захарова. — Пенза: Инс-т усоверш. врачей МЗ РФ, 2003. — 32 с.
3. Банкова, В. В. Роль малонового диальдегида в регуляции перекисного окисления липидов в норме и патологии: автореферат дис. ... д-ра биол. наук / В. В. Банкова. — М., 1990.
4. Болдырев, А. А. Проблемы анализа эндогенных продуктов ПОЛ / А. А. Болдырев // Итоги науки и техники. — 1986. — Т. 18. — 134 с.
5. Intraluminal increase of superoxide anion follow transient focal cerebral ischemia in rats / T. Mori [et al.] // Brain Res. — 1999. — Vol. 8, № 2. — P. 350–357.
6. Маргулис, М. А. Звукохимические реакции и сонолюминесценция / М. А. Маргулис. — М.: Химия, 1986. — С. 285.
7. Маргулис, М. А. Основы звукохимии / М. А. Маргулис. — М.: Высш. шк., 1984. — С. 271.
8. Маргулис, М. А. О возникновении гидратированных электронов в поле ультразвуковых волн / М. А. Маргулис, А. Н. Малцев // Журнал физической химии. — 1968. — Т. 42, № 10. — С. 2660–2663.
9. Химия и ультразвук / под ред. А. С. Козьмина. — М.: Мир, 1993. — С. 560.
10. Freeman, G. R. Radiation chemistry of ethanol: A review of data on yields, reactions rates parameters and spectral properties of transients / G. R. Freeman // NSRDS-NBS. — 1974. — № 48. — P. 56.
11. Hart, E. T. A review of the radiation chemistry of the hydrated electron in aqueous solution / E. T. Hart, J. K. Thomas, S. A. Gordon // Radiat. Res. — 1964. — Vol. 21, № 4. — P. 74–87.
12. Anbar, M. Selected specific rates of transients from water in aqueous solution. 1. Hydrated electron / M. Anbar, M. B. Ross // NSRDS-NBS. — 1973. — № 43. — P. 1–59.
13. Adams, G. E. Pulse radiolysis studies on the oxidation of organic radicals in aqueous solution / G. E. Adams, R. L. Willson // Trans. Faraday Soc. — 1969. — Vol. 65, № 9. — P. 2981–2987.

УДК: 61:577.3

КОМПЛЕКСНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ СО СВОБОДНЫМИ РАДИКАЛАМИ КИСЛОРОДА (МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА. ЧАСТЬ 2 — МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОН РАДИКАЛОВ И ДИЕНОВЫХ КОНЬЮГАТОВ

Игнатенко В. А., Калинин А. Л., Евтухова Л. А.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Специфическое действие ионизирующего излучения (энергии: УЗ, УФ, ионы металлов переменной валентности с H_2O_2) на биологические объекты реализуется через радикальные продукты образованные из воды. При этом механизм действия ионизирующей энергии проходит следующие стадии: физическую, физико-химическую, химическую и биологическую.

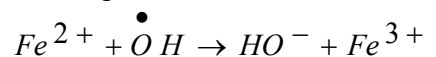
Цель

1. Обучение студентов методике определения продуктов перекисного окисления липидов на моделях.

2. Количественное определение $\dot{O}H$ радикалов и диеновых конъюгатов.

Методы

Для определения количества $\dot{O}H$ радикалов использовали реакцию:



Как известно, $FeSO_4$ содержит ионы железа Fe^{2+} . В работе [1] показано, что при взаимодействии Fe^{2+} с 1.1 фенантролином, растворенным в 0,1 Н растворе H_2SO_4 , образуется окрашенный железофенантролиновый комплекс с максимумом оптического поглощения при $\lambda = 510$ нм. Коэффициент экстинкции комплекса $\epsilon_{510} = 11100 \frac{L}{M^{-1}c^{-1}}$. Такое значение экстинкции позволяет спектрофотометрически определять количество Fe^{2+} .

В эксперименте раствор $FeSO_4$ облучали УЗ различной интенсивности, которую определяли измерителем мощности ИМУ-3. Количество образованного Fe^{3+} под действием УЗ определяли по формуле:

$$[Fe^{3+}] = \frac{D_{иск} - D_{он}}{\epsilon_{510}}$$

где $D_{иск}$ — оптическая плотность исходного количества Fe^{2+} определяемое по фенантролиновому комплексу; $D_{он}$ — оптическая плотность количества Fe^{2+} , оставшегося в результате облучения $FeSO_4$ определяемое по фенантролиновому комплексу; ϵ_{510} — экстинкция комплекса.

На рисунке 1 предоставлены кривые выхода Fe^{3+} от мощности, проводимой УЗ энергии и концентрации $FeSO_4$.

Стандартный феррасульфатный дозиметр имеет следующий состав: 2 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 г $NaCl$, 110 cm^3 концентрированный H_2SO_4 в дистиллированной воде на 5 л раствора.

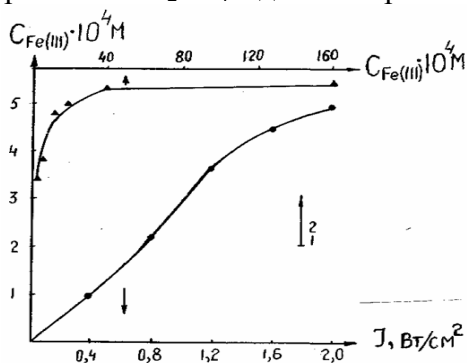


Рисунок 1 — Зависимость образования Fe^{3+} из Fe^{2+} под действием УЗ от мощности вводимый в раствор $FeSO_4$ энергии (1) и концентрации $FeSO_4$ — в облучаемых (2). Для кривой [1] $[FeSO_4] = 2 \cdot 10^{-3} M$. Для кривой (2) УЗ — 880 кГц, интенсивность 2 $Вт/см^2$. Время действия УЗ — 5 мин.

При образовании Fe^{3+} под действием вводимой энергии происходит увеличение поглощения на $\lambda = 305$ нм. (УФ область). Измеряя оптическую плотность, обработанного энергией раствора, определяют концентрацию Fe^{3+} , число свободных радикалов кислорода и поглощенную дозу. Определение Fe^{3+} можно производить и по разности оставшегося Fe^{2+} после действия энергии ионизирующего излучения и исходного не облученного раствора, считая, что изменение Fe^{2+} происходит при взаимодействии со

свободными радикалами и H_2O_2 . В этом случае измеряют концентрацию Fe^{2+} по его комплексу с 1,10 фенан-тролином на $\lambda = 510$ нм в видимой области спектра. Комплекс стабилен при pH 3,5–4,2.

По результатом опыта можно отметить: эффекты действия ионизирующих излучений зависят от концентрации кислорода в растворе и биологических средах. При насыщении раствора CO_2 и N_2 образование свободных радикалов уменьшается, что обусловлено, в основном, связанным кислородом, а не свободным.

Проведенные опыты позволяют оценить количество свободных гидроксильных радикалов, которые могут вызвать патологические изменения в биологических системах при действии ультразвука.

Диеновые конъюгаты (ДК). Определение диеновых конъюгатов имеет значительное преимущество для оценки ПОЛ, поскольку отражает раннюю стадию окисления. Обычным субстратом для определения диеновых конъюгатов выступает любое вещество, содержащее полиненасыщенные жирные кислоты. Диеновые конъюгаты обладают поглощением в УФ-области ($\lambda = 232$ нм), коэффициент молярной экстинкции $21\text{--}24 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Пробо-подготовка для анализа диеновых конъюгатов обязательно включает в себя экстрагирование липидов органическими растворителями.

Диеновые конъюгаты являются первичными продуктами ПОЛ. Например, при свободнорадикальном окислении арахидоновой кислоты происходит отрыв водорода в α -положении по отношению к двойной связи, что приводит к перемещению этой двойной связи с образованием ДК [2]. ДК, являющиеся первичными продуктами ПОЛ, относятся к токсическим метаболитам, [3] которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты.

Липопероксиды являются весьма нестойкими и подвергаются дальнейшей окислительной дегенерации. При этом накапливаются вторичные продукты окисления, наиболее важными из которых являются ненасыщенные альдегиды (малоновый диальдегид (МДА)). Продуктами взаимодействия МДА с аминокислотами являются шиффовы основания [4].

Образуются шиффовы основания в результате обратимой реакции между карбонильной группой альдегида или кетона со свободной аминогруппой [5]. Непрерывное накопление оснований Шиффа дестабилизирует мембраны и способствует деструкции клеток.

Определение содержания диеновых и триеновых конъюгатов, оснований Шиффа

Принцип метода. Метод основан на определении содержания продуктов ПОЛ в крови (исследуемых растворах или взвесах) по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в УФ области спектра. ДК, триеновые конъюгаты (ТК) и основание Шиффа (ОШ) экстрагируются в гептан-изопропанольных фракциях [6]. В гептане экстрагируются нейтральные липиды, а в изопропанол — фосфолипиды гептановая фракция свидетельствует об активности ПОЛ в нейтральных липидах, а изопропанольная — в фосфолипидах. Для этих целей используются следующие реактивы: н-Гептан, Изопропанол, 0,01 N водный раствор соляной кислоты, хлорид натрия прокаленный.

Ход определения продуктов экстрагирования: К 0,1 мл плазмы крови (исследуемых растворах или взвесах) добавляют 8 мл гептан-изопропанольной смеси в соотношении 1:1, встряхивают в течение 15 мин и центрифугируют при 6000 об/мин в течение 10 минут. Далее липидный экстракт переносят в чистую пробирку и добавляют 5 мл гептан-изопропанольной смеси в соотношении 3:7, после чего в пробирку добавляют 2 мл 0,01 N водного раствора соляной кислоты для разведения фаз и удаления нелипидных примесей. После разделения фаз (верхнюю) гептановую переносят в чистую пробирку, а к нижней добавляют 1 г прокаленного хлорида натрия для обезвоживания изопропанольного экстракта, который переносят в чистую пробирку. Замер оптических

плотностей (D) производят на спектрофотометре. Каждая фаза оценивается против соответствующего контроля при длинах волн 220 нм (поглощение изолированных двойных связей), 232 нм (поглощение ДК), 278 нм (поглощение ТК) и 400 нм (поглощение ОШ). Содержание ДК, ТК и ОШ оценивают по относительным величинам D_{232} / D_{220} , D_{278} / D_{220} , D_{400} / D_{220} и выражают в относительных единицах.

При анализе с использованием ВЭЖХ, установлено, что ДК, образующиеся в организме человека, в основном представлены изомерами линолевой кислоты, октодека-9 (цис), 11(транс)-диеновой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fricke, H. Chemical dosimeter ch 12 in Radiation dosimetry / H. Fricke, E. J. Hart. — Instrumentation. — Academic Press. — 1966 — Vol. 2. — P. 167–239.
2. Чеснокова, Н. П. Типовые патологические процессы / Н. П. Чеснокова. — Саратов: Саратовский медицинский университет, 2004. — С. 132–136.
3. Состояние перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты крови у больных инфарктом миокарда, отягощенным недостаточностью кровообращения / Н. И. Тарасов [и др.] // Тер. архив. — 2002. — № 12. — С. 12–15.
4. Курашвили, Л. В. Современное представление о перекисном окислении липидов и антиоксидантной системе при патологических состояниях: метод. пособие / Л. В. Курашвили, Г. А. Косой, И. Р. Захарова. — Пенза: Инс-т усоверш. врачей МЗ РФ, 2003. — 32 с.
5. Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. — М.: Наука, 2002. — 446 с.
6. Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови / А. В. Дерюгина [и др.] // Н.-Новгород: Нижегородский государственный университет, 2010. — 25 с.

УДК: 61:577.3

КОМПЛЕКСНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ СО СВОБОДНЫМИ РАДИКАЛАМИ КИСЛОРОДА (МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА. ЧАСТЬ 3 — МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАЛОНОВОГО АЛЬДЕГИДА И ТИОЛОВЫХ ГРУПП МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ)

Игнатенко В. А., Калинин А. Л., Евтухова Л. А.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Малоновый диальдегид (МДА) — вторичные продукты ПОЛ. Как известно, МДА образуется только из жирных кислот с 3-мя и более двойными связями. МДА принадлежит важная роль в синтезе простагландинов, прогестерона и других стероидов [1]. Отрицательная роль МДА заключается в том, что он сшивает молекулы липидов и понижает текучесть мембраны. Вследствие этого мембрана становится более хрупкой. Нарушаются процессы связанные с изменением поверхности мембраны: фагоцитоз, пиноцитоз, клеточная миграция и др. [1].

Гидроперекиси, ненасыщенные альдегиды, являются мутагенами и обладают выраженной цитотоксичностью. Они подавляют активность гликолиза и окислительного фосфорилирования, ингибируют синтез белка и нуклеиновых кислот, нарушают секрецию триглицеридов гепатоцитами, ингибируют различные мембраносвязанные ферменты [2].

Определение количества образующегося МДА с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК) может быть одним из методов оценки интенсивности процессов перекисного окисления липидов [3, 4].

Принцип метода. В основе метода лежит реакция между МДА и ТБК, которая при температуре 90–100 °С и кислом значении рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты. Максимум поглощения комплекса приходится на 532 нм (зеленый светофильтр) [5, 6].