

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВОЛГОГРАДСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

На правах рукописи

МКИ А61К31/00

УДК 577.3:615.272.4

ЗАЙЦЕВ Валерий Геннадьевич

МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И
ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

03.00.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

профессор Закревский В.И.,

доктор медицинских наук

профессор Островский О.В.

ВОЛГОГРАД – 2001

ВВЕДЕНИЕ	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Актуальность поиска лекарственных препаратов с антиоксидантным действием	13
1.2. Современные представления об антиоксидантах	15
1.2.1. Антиоксиданты прямого действия. Классификация. Механизмы действия	17
1.2.2. Прооксидантное действие антиоксидантов.....	25
1.3. Модельные системы перекисного окисления липидов для оценки антиоксидантной активности химических соединений в опытах <i>in vitro</i> ...	27
1.3.1. Особенности перекисного окисления липидов.....	29
1.3.2. Субстраты для модельных систем перекисного окисления липидов ...	31
1.3.3. Способы инициации перекисного окисления липидов в модельных системах	38
1.3.4. Индикация интенсивности процессов свободнорадикального окисления липидов в модельных системах.....	43
Глава 2. Материалы и методы исследования	52
Материалы и реактивы	52
Оборудование.....	52
Приготовление липосом	53
Окисление липосом	53
Определение концентрации карбонильных соединений с использованием N- (2,4-динитрофенил)гидразина	53

Определение концентрации веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой.....	54
Определение содержания конъюгированных диенов и кротонового альдегида	54
Исследованные химические соединения.....	54
Оценка эффективности антиоксидантного действия	55
Статистические методы.....	56
Глава 3. Разработка и оптимизация применения модельной системы для оценки антиоксидантного действия веществ на основе липосом	57
3.1. Сравнительная оценка применимости методов определения карбонильных продуктов ПОЛ с использованием тиобарбитуровой кислоты и 2,4-динитро-фенилгидразина в липосомальной модельной системе.....	57
3.1.1. Применимость метода определения веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ВР-ТБК), для оценки уровня ПОЛ в модельной системе	57
3.1.2. Применимость метода определения карбонильных соединений с использованием 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) для оценки уровня ПОЛ в модельной системе.....	61
3.1.3. Сравнительное определение содержания различных продуктов ПОЛ в окисленных липосомах	64
3.2. Оптимизация условий применения модельной системы ПОЛ на основе липосом с Cu^{2+} -зависимой индукцией окисления.....	67
3.2.1. Зависимость накопления карбонильных соединений в липосомах от длительности периода окисления и особенностей инициации процесса ПОЛ	67

3.2.2. Влияние концентрации фосфатидилхолина на накопление карбонильных соединений в липосомах в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ	74
3.2.3. Возможность использования буферных растворов в модельной системе на основе липосом при Cu^{2+} -зависимой индукции ПОЛ	77
Глава 4. Оценка особенностей антиоксидантного действия лекарственных препаратов с использованием модельной системы ПОЛ на основе фосфатидилхолиновых липосом	83
4.1. Влияние липофильных антиоксидантов на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомальной модельной системе.....	83
4.1.1. Особенности влияния липофильных фенольных антиоксидантов на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах	83
4.1.2. Особенности влияния липофильных соединений, содержащих несколько двойных связей, на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах	90
4.2. Влияние гидрофильных антиоксидантов на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомальной модельной системе.....	93
4.2.1. Особенности влияния тиолов на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах	93
4.2.2. Особенности влияния таурина на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах	95
4.2.3. Особенности влияния комплексообразующих карбоновых кислот на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах	96
Заключение.....	101
Выводы	106

Список использованной литературы	108
Приложение 1. Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений, образующихся при ПОЛ липосом в зависимости от способа инициации и длительности периода окисления	126
Приложение 2. Зависимость содержания карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых индуцированному окислению, от концентрации ацетата натрия в инкубационной среде.....	134
Приложение 3. Коэффициенты линейной корреляции Пирсона между концентрацией карбонильных продуктов в ходе окисления фосфатидилхолиновых липосом и концентрацией липида.....	136
Приложение 4. Влияние буферного раствора на основе MES – NaOH на содержание карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых спонтанному индуцированному окислению.	137
Приложение 5. Влияние буферных растворов (рН 6,0) на основе карбоновых кислот на содержание карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых индуцированному окислению.....	138

СПИСОК УПОТРЕБЛЯЕМЫХ В ТЕКСТЕ СОКРАЩЕНИЙ

АО	– антиоксидант(ы)
АОС	– антиоксидантная система
АФК	– активные формы кислорода
ВР-ТБК	– вещества, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГП	– глутатионпероксидаза
ГПЛ	– гидропероксиды липидов
ДНФГ	– 2,4-динитрофенилгидразин
ЛНП	– липопротеины низкой плотности
МДА	– малоновый диальдегид
МС	– модельная система
НСТ	– нитросиний тетразолий
о.е.	– оптическая единица
ПНЖК	– полиненасыщенные жирные кислоты
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
СОД	– супероксиддисмутаза
СРО	– свободнорадикальное окисление
ТБК	– 2-тиобарбитуровая кислота
ФМС	– феназинметосульфат
ХЛ	– хемиллюминесценция
ЭДТА	– этилендиаминотетрауксусная кислота
М	– среднее арифметическое
SD	– стандартное отклонение
SEM	– стандартная ошибка среднего
ϵ_{λ}	– коэффициент экстинкции вещества при длине волны λ нм

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Существование живых организмов на Земле (за исключением некоторого количества облигатных анаэробных микроорганизмов) невозможно себе представить в отсутствии кислорода, являющегося неотъемлемым компонентом метаболических процессов в живых клетках. Однако существование организмов в богатой кислородом окружающей среде несет в себе и постоянную угрозу для их существования.

При включении кислорода в процессы жизнедеятельности организмов постоянно в существенном количестве образуются различные активированные производные молекулярного кислорода — активные формы кислорода (АФК). Одновременно, биомолекулы могут легко подвергаться окислению и разрушению под действием АФК. Соответственно, выживание организмов в кислородной среде весьма сильно зависит от предотвращения и репарации окислительных повреждений в организме.

Для ограничения интенсивности свободнорадикальных процессов и уровня окислительных повреждений в живых организмах в ходе эволюции возникла особая антиоксидантная система (АОС), состоящая из большого числа согласованно работающих специфических ферментов и группы низкомолекулярных природных антиоксидантов. При различных отклонениях от нормального функционирования организма может развиваться дисбаланс между интенсивностью продукции АФК и свободнорадикального окисления (СРО) и уровнем функциональной активности АОС. Это, в свою очередь, вызывает усиление окислительных повреждений биомолекул, развитие дисфункции клеток и тканей и, в конечном итоге, гибель организма. При патологических состояниях у человека рассмотренный дисбаланс может быть полностью или частично скорректирован применением в качестве лекарственных средств природных или синтетических антиоксидантов.

К настоящему времени накоплен обширный материал о многих тонких механизмах протекания процессов СРО и предложено для медицинского применения значительное число антиоксидантных препаратов. Выявлены некоторые механизмы действия отдельных групп химических соединений, проявляющих антиоксидантные свойства. Выявлены структурные компоненты, наличие которых в молекуле вещества яв-

ляется необходимым или существенным фактором для проявления антиоксидантных свойств. Однако использование разными исследовательскими группами отличающихся подходов для выявления антиоксидантных свойств у химических соединений создает определенные сложности в сравнении результатов. Важнейшей методологической проблемой является отсутствие детально разработанного комплекса систем моделирования СРО *in vitro*, позволяющего унифицированным образом осуществлять скрининг новых АО с требуемыми свойствами. Важной в этом плане представляется разработка модельных систем перекисного окисления липидов (ПОЛ), с помощью которых можно не только выявлять наличие антиоксидантных свойств у химических соединений в ходе систематических скрининговых исследований, но и изучать одновременно механизм и особенности действия этих веществ в различных условиях протекания процессов ПОЛ.

Применение в таких исследованиях тест-систем с длительным протеканием ПОЛ может позволить выявить отдаленные эффекты АО в условиях, когда с течением времени концентрация АО уменьшается, а интенсивность ПОЛ возрастает. Указанный подход может оказаться полезным для моделирования *in vitro* поведения АО при длительном окислительном стрессе организма, когда повышенная интенсивность ПОЛ наблюдается на фоне истощения пула АО.

Важно также отметить, что АО способны проявлять прооксидантные свойства. Условия и химико-структурные основы стимуляции СРО под действием АО изучены недостаточно. Основными выявленными на сегодняшний день факторами, определяющими возможность инверсии антиоксидантных свойств, являются концентрация самого АО, концентрация и химическая структура субстрата окисления и наличие в реакционной среде катионов металлов переходной валентности. В то же время вопрос о влиянии продолжительности протекания процесса ПОЛ на возможность проявления прооксидантного действия АО остается открытым.

Понимание взаимосвязи между структурой АО и изменением их свойств в зависимости от временного этапа процесса СРО позволит приблизиться к возможности синтеза и выявления химических соединений с максимально предсказуемыми особенностями антиоксидантных свойств, на основе которых могли бы быть созданы новые лекарственные препараты с антиоксидантным действием.

Тема диссертации является составной частью плана научно-исследовательской работы Волгоградской государственной медицинской академии и утверждена на заседании Ученого совета Волгоградской государственной медицинской академии (протокол № 4 от 8 декабря 1999 г.).

Цель исследования:

Разработка модельных тест-систем для скрининга и первичной оценки мишеней и особенностей действия антиоксидантов, а также оценка антиоксидантных и прооксидантных свойств биологически активных веществ различной химической природы.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительное изучение и выбрать оптимальный метод оценки интенсивности перекисного окисления липидов в суспензии липосом.
2. Определить условия применения модельных систем перекисного окисления липидов на основе липосом для скрининга лекарственных препаратов антиоксидантного действия, выявления мишеней и условий проявления антиоксидантной активности.
3. Установить особенности антиоксидантного действия химических соединений в зависимости от природы и свойств функциональных групп, определяющих антиоксидантную активность соединений, на различных временных этапах перекисного окисления липидов.
4. Выявить у антиоксидантов различной химической природы возможность и условия потери антиоксидантных свойств и их трансформации (инверсии) в прооксидантные.

Научная новизна работы

Доказано, что изменение концентрации карбонильных соединений, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ), может быть использовано для оценки интенсивности ПОЛ в липосомальных модельных системах, в том числе при инициации ПОЛ металлами переходной валентности.

Показано, что использование тиобарбитуровой кислоты для определения карбонильных продуктов ПОЛ в целях оценки интенсивности ПОЛ может приводить к неадекватным результатам в случае металло-зависимой индукции ПОЛ.

Впервые обнаружено, что эффективность действия антиоксидантов изменяется в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ в липосомах. Выявлено, что на отсроченных этапах ПОЛ (длительность окисления 24 ч и более) антиоксидантная активность химических соединений может усиливаться, пропадать или инвертироваться в прооксидантную активность.

Впервые установлены характерные особенности динамики изменения эффективности антиоксидантного действия антиоксидантов различной химической природы в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ в липосомальной модельной системе.

Практическая ценность работы

Разработанные подходы к построению липосомальных модельных систем ПОЛ и способ оценки интенсивности ПОЛ в липосомах могут послужить основой для создания унифицированного комплекса методов выявления и оценки особенностей антиоксидантного действия веществ различной химической природы в ходе скрининговых испытаний. Описанная нами модельная система ПОЛ в условиях длительно протекающего окисления липосом позволяет выявлять наличие у конкретных антиоксидантов зависимой от длительности периода протекания ПОЛ трансформации (инверсии) антиоксидантных свойств в прооксидантные.

Реализация результатов исследования

Разработанная модельная система используется в исследованиях веществ с антиоксидантной активностью на кафедре фармакологии и в изучении процессов перекисного окисления липидов на кафедре биологической химии Волгоградской медицинской академии. Методика определения карбонильных продуктов ПОЛ с использованием ДНФГ применяется в учебном процессе на кафедре биологической химии Волгоградской медицинской академии.

Разработанный нами подход к оценке интенсивности ПОЛ в модельных системах оформлен рационализаторским предложением («Способ оценки интенсивности перекисного окисления липидов в липосомах по содержанию карбонильных соединений»),

удостоверение № 10–2001 от 6 февраля 2001 г., выданное Волгоградской медицинской академией). Разработаны методические рекомендации «Выявление и оценка особенностей антиоксидантного действия химических соединений в модельной системе на основе липосом» (утверждены 5 июля 2001 г.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Модельная система длительно протекающего процесса ПОЛ на основе суспензии фосфатидилхолиновых липосом с использованием различных инициаторов окисления и оценкой уровня ПОЛ по содержанию карбонильных соединений, реагирующих с ДНФГ, может служить тест-системой для скринингового выявления антиоксидантных свойств у лекарственных препаратов различной химической природы.
2. Эффективность действия антиоксидантных препаратов изменяется в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ в липосомах. Особенности антиоксидантного действия в зависимости от длительности периода окисления определяются химической природой вещества.
3. Антиоксиданты различной химической природы и различного механизма действия обладают способностью к трансформации (инверсии) антиоксидантной активности в прооксидантную.

Апробация работы

Основные положения работы доложены на научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии», посвященной 100-летию кафедры биохимии Санкт-Петербургского медицинского университета им. И.П.Павлова (Санкт-Петербург, 15 – 17 октября 1998 г.); на Российской национальной конференции с международным участием «Свободные радикалы и болезни человека» (Смоленск, 19 – 22 сентября 1999 г.); на научной сессии сотрудников Волгоградской медицинской академии (Волгоград, 5 – 9 октября 1999 г.); на научной конференции, посвященной 125-летию со дня рождения А.А. Ухтомского (Волгоград, 16 – 17 января 2001 г.); на 5-й Пущинской открытой конференции молодых ученых «Биология — наука 21-го века» (Пущино, 16 – 20 апреля 2001 г.); на конференции «Проблемы медицины и биологии» Кемеровской государственной медицинской ака-

демии (Кемерово, 19–20 апреля 2001 г.); на 66-й Республиканской конференции студентов и молодых ученых Башкортостана (Уфа, 26 апреля 2001 г.); на заседаниях Волгоградского отделения Биохимического общества РАН в 1999 – 2001 гг.

Диссертация обсуждена на совместном заседании кафедр фармакологии и биологической химии Волгоградской государственной медицинской академии.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, двух глав результатов собственных исследований, главы обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Список использованной литературы включает 195 источника, из них 39 отечественных и 156 иностранных авторов. Диссертация иллюстрирована 7 таблицами и 21 рисунком.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальность поиска лекарственных препаратов с антиоксидантным действием

В процессе метаболизма в клетках аэробных организмов постоянно образуются токсичные активные формы кислорода. АФК способны инициировать в организме реакции свободнорадикального окисления, вызывающие повреждение различных белков и пептидов [14, 49, 62, 103, 170], азотистых оснований и нуклеиновых кислот [31, 47, 90, 98], липидов [147, 171, 180] и других биомолекул. Основным субстратом СРО *in vivo* являются липиды [37, 92, 147, 162, 180]. Соответственно, процессы перекисного окисления липидов вносят основной вклад в общую интенсивность СРО *in vivo* [77, 92, 95]. При этом существенная часть цитотоксического действия СРО связана с карбонильными продуктами ПОЛ, способными образовывать аддукты с белками [180] и липидами [85]. Подчеркнем, что в проявлении токсического действия процессов СРО принимают участие **все** АФК, способные образовываться в живых организмах, и большинство продуктов СРО [77, 162].

Для защиты от повреждающего действия СРО в живых организмах существуют механизмы, сводящие к минимуму образование АФК в организме, и специальная антиоксидантная система, эффективно элиминирующая АФК, образования которых не удалось избежать, и утилизирующая токсические продукты СРО [144, 162, 180]. В нормальном состоянии стимуляция СРО в организме в результате каких-либо изменений в окружающей среде компенсируется адекватным повышением активности АОС [162]. Однако при патологических изменениях в организме в силу тех или иных причин развивается дисбаланс между интенсивностью свободнорадикальных процессов и функциональной активностью АОС [42, 92, 95]. Указанный дисбаланс играет ключевую роль в развитии таких широко распространенных заболеваний, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, нейродегенеративные заболевания, гепатит, диабетические ангиопатии, катаракта, некоторые формы рака, болезнь Дауна, аутоиммунные заболевания [11, 27, 42, 55, 117, 123, 132, 161, 194]. В то же время, у некоторых лекарственных препаратов, используемых для терапии указанных заболеваний, были обнаружены прооксидантные свойства [19, 45, 185]. Дополнительным фактором

риска нарушения оксидантно-антиоксидантного баланса является загрязнение окружающей среды химическими соединениями антропогенного происхождения, поскольку многие из них способны стимулировать процессы СРО или инактивировать компоненты АОС в живых организмах [23, 29, 64, 104, 176, 182, 193].

Тот факт, что нарушения баланса интенсивности СРО и функционального статуса АОС широко встречаются при патологии, а также возможность значительного отягощения течения любого заболевания усилением интенсивности СРО диктуют необходимость поиска путей диетологической и фармакологической коррекции нарушений указанного баланса [41, 154]. Во многих исследованиях последних лет, однако, была показана неэффективность обычно применяемых антиоксидантов (АО) (витамины А, С, Е, каротин) при заболеваниях, в которых дисбаланс между интенсивностью СРО и статусом АОС играет существенную патогенетическую роль [1, 33, 101, 151].

Указанные предпосылки определяют актуальность целенаправленного поиска АО с конкретными мишенями действия и определенными особенностями проявления антиоксидантных свойств. Важным этапом такого поиска является скрининг химических соединений, позволяющий отобрать АО с определенным набором свойств, заданных целями работы. Однако проведение соответствующих исследований наталкивается на ряд методологических трудностей. Существенной проблемой является отсутствие детально разработанного комплекса систем моделирования ПОЛ *in vitro*, который позволил бы унифицированным образом осуществлять скрининг новых АО с определенными требуемыми свойствами.

Говоря об АО, следует также отметить, что в последние годы во многих работах была показана возможность проявления прооксидантного действия АО [26, 67, 106, 138, 158, 181]. Кроме того, для различных АО свойственны определенные особенности химического и фармакологического взаимодействия между собой, что может выражаться как во взаимном синергичном усилении антиоксидантного действия, так и в потере антиоксидантных свойств или даже в проявлении прооксидантного действия [9, 78, 79, 97, 158, 160, 175].

Следовательно, говоря о комплексе подходов для скрининга новых АО, необходимо особенно подчеркнуть, что на этапе скринингового отбора желательно не просто выявлять наличие у конкретного вещества антиоксидантных свойств, но и иметь воз-

возможность предварительной оценки мишени антиоксидантного действия и возможность проявления исследуемым веществом прооксидантного действия.

1.2. Современные представления об антиоксидантах

С самого начала изучения процессов СРО начался и поиск веществ, способных тормозить или подавлять реакции СРО. Такие вещества получили название «антиоксидантов». Следует, однако, отметить, что хотя термин «АО» широко используется в биомедицинской литературе, но, как подчеркивают Б. Холлиуэлл и Дж. Гатридж [94], в научных публикациях редко приводится его определение, что создает определенные сложности в трактовке этого понятия.

Так, А.И. Журавлев определяет АО биологического происхождения чисто описательно: «Биоантиокислители — соединения, основная биологическая функция которых заключается в антиокислительной активности» [17]. Ю.А. Владимиров использует более узкое определение: «Антиоксиданты — это соединения, которые препятствуют образованию свободных радикалов» [8]. Его, однако, нельзя назвать корректным, поскольку функция АО заключена не только (а возможно, и не столько) в подавлении образования радикалов, но и, — в не меньшей степени, — в их элиминации или снижении реакционной способности. Кроме того, многие АО в процессе своего антиоксидантного действия сами превращаются в радикалы, значит, в этом случае, нельзя говорить об уменьшении числа радикалов.

Наиболее адекватное с химической точки зрения определение дано Б. Холлиуэллом и Дж. Гатриджем [94]: «Антиоксидант — любая субстанция, которая, присутствуя [в среде] в низкой концентрации, сравнимой с концентрацией способного окисляться субстрата, достоверно снижает или предотвращает окисление этого субстрата». Это определение наиболее полно описывает критерии и условия выявления антиоксидантных свойств, особо подчеркивая важность того, какие инициатор и мишень окисления (способный окисляться субстрат) используются для выявления АО.

Действительно, используемый способ инициации СРО в существенной степени определяет, во-первых, будет ли конкретное вещество X проявлять антиоксидантные свойства, во-вторых, как расположатся АО в ряду эффективности ингибирования реакций СРО. Так, если мишенью окисления является плазма крови, то при инициации

ПОЛ водорастворимыми азобис-соединениями лучшим АО оказывается аскорбиновая кислота. При Fe^{2+} -зависимой инициации наибольшую антиоксидантную активность проявляют трансферрин, церулоплазмин, а аскорбиновая кислота, наоборот, проявляет прооксидантные свойства [86, 87, 93]. В плазме крови мочевиная кислота является наилучшим АО при инициации ПОЛ NO_2 [96], но очень слабо защищает от окисления под действием гипохлорита (OCl^-) как липиды [100], так и белки [192]. Наиболее эффективными же АО в этих условиях оказались водорастворимые тиолы [192]. Пробукол и его метаболит бисфенол Н 212/43 частично предотвращают окисление ЛНП человека при индукции ПОЛ перокси-радикалами, в то время как в случае Cu^{2+} -индуцированного ПОЛ эффективен только пробукол [186].

Сходным образом, в зависимости от используемой мишени СРО при анализе антиоксидантной активности вещества X могут быть получены различные результаты. Например, при инкубации плазмы крови с сигаретным дымом происходит стимуляция СРО [74], причем аскорбиновая кислота в этих условиях способна ингибировать ПОЛ [74], но не снижает уровень окислительного повреждения белков [153]. Аналогично, α -токоферол и пробукол эффективно подавляют ПОЛ [120, 186], но неспособны защищать белки от окислительного повреждения [192].

Впрочем, само по себе отнесение вещества по данным лабораторного анализа к АО или прооксидантам может иметь мало отношения к биологической значимости анти- или прооксидантной активности этого вещества [94]. В сущности, достаточно легко обнаружить наличие антиоксидантных свойств у конкретного вещества в тех или иных тестах *in vitro*. Намного сложнее доказать, что та или иная субстанция реально действует *in vivo* по какому-либо антиоксидантному механизму [89]. Для вещества, поступающего в организм извне, существует множество вариантов снижать интенсивность СРО: прямое антирадикальное действие [6, 140]; влияние на стабильность промежуточных продуктов СРО; активация или реактивация антиоксидантных ферментов [52, 59, 81]; селективная индукция или подавление экспрессии определенных генов, кодирующих белки, вовлеченные в процессы подавления СРО или репарации их последствий [130]; сдвиг реакций СРО в сторону образования менее реакционноспособных продуктов СРО; подавление в организме реакций, приводящих к образованию инициаторов СРО [184], и т.д.

Фактически, все вещества, проявляющие антиоксидантное действие *in vivo*, могут быть разделены на:

- АО прямого (направленного) действия, обладающие способностью снижать интенсивность процессов СРО в химических тест-системах, т.е., когда можно определенно говорить о прямом влиянии вещества на процессы СРО;
- АО косвенного (опосредованного) действия, способные снижать интенсивность СРО только в биологических объектах, но не в химических тест-системах.

Соответственно этому делению такие АО, как например, ионол, токоферолы или полифенолы будут относиться к группе АО прямого действия. С другой стороны, например, никотинамид, способствующий повышению в организме уровня NAD(P)H, необходимого для обеспечения рециркуляции глутатиона, может рассматриваться как АО косвенного действия, способствующий снижению интенсивности СРО путем активации компонентов АОС.

Не следует также забывать, что одно и то же вещество в различных условиях (или в отношении различных исследуемых объектов) может в одних случаях проявлять антиоксидантное, а в других — прооксидантное действие. Проявление в определенных условиях прооксидантных свойств было показано для таких широко применяемых АО, как токоферолы [6], каротиноиды [26] и аскорбиновая кислота [10, 48].

1.2.1. Антиоксиданты прямого действия. Классификация. Механизмы действия

При поиске новых АО, обладающих перспективами клинического применения, в настоящий момент основное внимание уделяется АО прямого действия [41, 154], что связано в первую очередь с двумя причинами: во-первых, первичный скрининг таких АО достаточно эффективно проводится с использованием относительно простых тест-систем *in vitro*, а во-вторых, эффективность АО прямого действия в меньшей степени зависит от функционального состояния метаболических систем организма.

Отсутствие общепринятой классификации АО прямого действия в определенной степени связано с тем, что для конкретных исследовательских и практических целей наиболее удобным является деление АО¹ по различным критериям. Простейшая клас-

¹ Далее под этим термином мы будем понимать только АО прямого действия.

сификация АО основана на их растворимости в водной и липидной фазе и позволяет разделить АО на две группы: гидрофильные (водорастворимые; например, аскорбиновая кислота, мочева кислота, цистеин) и липофильные (жирорастворимые; токоферолы, ретинол, билирубин) [8, 21]. Эта классификация позволяет оценить, в каких (липидных или водных) компартментах организма преимущественно будут концентрироваться и, соответственно, эффективно действовать те или иные АО. Однако эта классификация не позволяет группировать АО по механизму их действия.

Эту возможность дает классификация, основанная на делении АО по конкретным мишеням их действия (АФК, нерадикальные инициаторы СРО, радикалы–промежуточные продукты СРО и т.д.) [21, 154]. Тем не менее эта классификация не слишком подходит для использования в целях поиска новых соединений с антиоксидантной активностью, поскольку не учитывает химической структуры АО и, следовательно, не позволяет с той или иной долей уверенности предсказывать возможность наличия антиоксидантных свойств и эффективность действия вещества X с определенного химического строения.

Решению подобной задачи в большей степени соответствует классификация АО по их химической структуре (фенольные АО, тиолы, каротиноиды, гидроксаматы и т.д.) [154]. Такой способ группировки АО позволяет искать новые перспективные соединения среди более узких определенных групп веществ с одновременным учетом степени их липофильности.

Тем не менее, наиболее удобным представляется совмещение достоинства перечисленных классификаций, подразделяя АО по наличию в структуре молекулы определенных функциональных групп, связанных с проявлением антиоксидантных свойств. В этом случае наиболее наглядна взаимосвязь между химической структурой и свойствами АО, то есть зависимость между наличием определенных функциональных групп и механизмом действия АО. Анализ имеющихся литературных данных [8, 41, 92, 154] позволяет сгруппировать АО в четыре основные категории (табл. 1): АО – доноры протона, АО с ненасыщенными связями, АО – катализаторы и АО – комплексообразователи. Сразу же отметим, что последняя категория АО способна ингибировать только те процессы СРО, в инициацию и/или развитие которых вовлечены ка-

тионы металлов. Также следует сказать, что не все комплексообразователи являются АО, наоборот, некоторые из них способны стимулировать реакции СРО.

Разумеется, подобная классификация не претендует на абсолютную полноту, поскольку учитывает лишь основные структурные элементы молекул, отвечающие за проявление веществом антиоксидантных свойств. Однако предлагаемое деление удобно использовать в работах по поиску и первичному скринингу новых АО прямого действия с определенным (заданным) механизмом действия.

Комментируя сведения, суммированные в таблице, следует обратить особое внимание на группу АО — комплексообразователей. Дело в том, что соединения, обладающие комплексообразующими свойствами, способны проявлять не только анти-, но и прооксидантные свойства. Причем прооксидантное действие зависит не только от химической природы вещества, но и от природы инициаторов процессов СРО.

Так, в условиях Fe^{2+} -индуцированного ПОЛ липосом этилендиаминотетрауксусная кислота (ЭДТА) удлиняет латентный период развития хемилюминесценции, что говорит о ее антиоксидантном действии. ЭДТА также является эффективным антиоксидантом при Cu^{2+} -зависимой стимуляции ПОЛ [92]. С другой стороны, в присутствии H_2O_2 , органических гидропероксидов или аскорбиновой кислоты комплексы ЭДТА с Fe^{2+} или Fe^{3+} существенно увеличивают скорость образования $\cdot\text{OH}$ в сравнении с соответствующими катионами [82, 92, 155]. 1,10-батофенантролин подавляет Fe^{2+} -зависимое и усиливает Cu^{2+} -зависимое образование $\cdot\text{OH}$ в присутствии H_2O_2 [92]. Десфероксамин и карнозин проявляют эффективное антиоксидантное действие в металло-зависимых МС ПОЛ даже в присутствии H_2O_2 [92], но нитрилотриуксусная кислота и 8-гидроксихинолин существенно усиливают прооксидантное действие катионов переходных металлов [56]. С другой стороны, образование комплексов с Fe^{3+} является одним из механизмов антиоксидантного действия некоторых флавоноидов [107] и ведущим механизмом антиоксидантного действия лекарственного препарата карведилола (Дилатренд™) [172] и изоникотиноильных соединений [99].

Таблица 1

Антиоксиданты прямого действия

Категория	Свойства	Прооксидантное действие	Представители
А. Доноры протона	<p>Вещества с подвижным атомом водорода. Перехватывают свободные радикалы по реакции: $\text{AH} + \text{X}^\bullet \rightarrow \text{A}^\bullet + \text{XH}$, где AH – АО с подвижным атомом водорода, а X^\bullet – радикальный инициатор или промежуточный радикальный продукт СРО. Радикалы A^\bullet, в зависимости от соотношений концентраций реагирующих соединений и условий протекания реакции, могут элиминироваться при взаимодействии с радикалами X^\bullet или A^\bullet либо вступают в побочные реакции продолжения цепи СРО [6, 37]. Антирадикальная активность АО – доноров протона может не коррелировать с эффективностью ингибирования ПОЛ [6, 95]. Наиболее обширная категория АО.</p>	Могут проявлять	

Категория	Свойства	Прооксидантное действие	Представители
A1. Вещества с фенольной группой	<p>Основным механизмом антиоксидантного действия веществ этой группы является взаимодействие с образующимися в ходе ПОЛ перокси-радикалами [6, 37, 51, 134], в то время как с радикальными АФК фенольные АО взаимодействуют очень слабо [6, 51]. Некоторые АО фенольного типа (например, часть флавоноидов) способны хелатировать катионы металлов [107], выступая в роли АО-комплексообразователей.</p>	<p>Свойственно, особенно в металл-зависимых реакциях ПОЛ [6, 40, 54, 111, 138].</p>	<p>Токоферолы [6, 16, 140], ионол [140], пробукол [51, 120], производные фенолов и нафтолов [140], флавоноиды [5, 83, 113, 157, 159], растительные фенолы [5, 40, 135, 145], эстрогены [43, 122, 174], лазароиды [154].</p>
A2. Азот-содержащие гетероциклические вещества.	<p>По-видимому, аналогичен механизму действия фенольных АО.</p>	<p>?</p>	<p>Мелатонин [128], производные 1,4-дигидропиридина [156], 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин [110], производные пирролопиримидина [155].</p>

Категория	Свойства	Прооксидантное действие	Представители
A3. Тиолы	Механизм действия двойственный, поскольку тиоловые АО способны как к взаимодействию с радикалами по указанной выше схеме реакции, так и к комплексообразованию с катионами металлов переходной валентности.	За счет образования тиольных радикалов [179].	Глутатион [57, 160], цистеин, N-ацетилцистеин [160], гомоцистеин, дигидролипоевая кислота [192], эрготионеин.
A4. α,β -Диенолы	Установлен механизм действия аскорбиновой кислоты [10]: она легко окисляется под действием АФК до дегидроаскорбиновой кислоты (обратимо).	Характерно [35, 48, 53].	Аскорбиновая кислота [10, 125, 126].
A5. Порфирины	Механизм действия, по-видимому, множественный: доноры протона, комплексообразователи, катализаторы (в виде комплексов с катионами некоторых металлов – <i>см. ниже</i>).	?	Билирубин [15, 187].

Категория	Свойства	Прооксидантное действие	Представители
Б. С ненасыщенными связями	Легко окисляются, конкурируя за окислители и свободные радикалы с биомолекулами и тем самым защищая последние от окисления [139, 154]. Способны взаимодействовать с различными свободными радикалами, ковалентно присоединяя их по двойной связи [118]. Сами по себе обладают невысокой антиоксидантной активностью [7], но сочетание с АО – донорами протона (при условии более высокой молярной концентрации последних) приводит к синергичному усилению антиоксидантного эффекта смеси [175].	Могут проявлять [26, 139, 154]	Ретиноиды (ретинол и его эфиры, ретиналь, ретиноевая кислота) и каротиноиды (каротины, ликопин, спириллоксантин, астацин, астаксантин и др.) [139].
В. Катализаторы	Способны катализировать элиминацию АФК и промежуточных продуктов ПОЛ без образования новых свободных радикалов.	?	
В1. Имитаторы СОД	Катализируют дисмутацию супероксид-аниона подобно ферменту супероксиддисмутазе (СОД). Могут быть эффективны, когда сама СОД неэффективна [61].	?	Металлопорфирины [61, 127, 141].

Категория	Свойства	Прооксидантное действие	Представители
В2. Имитаторы ГП	Способны в присутствии глутатиона и в условиях, близких к физиологическим, метаболизировать H_2O_2 и органические гидропероксиды подобно глутатионпероксидазе (ГП) [150].	?	Селеноорганические вещества [150].
Г. Комплексообразователи	Ингибируют только металло-зависимые реакции СРО за счет связывания катионов металлов переходной валентности, катализирующих реакции образования АФК [8, 80]. Способность образовавшихся комплексов участвовать в реакциях СРО зависит как от природы комплекса, так и от большого числа иных факторов [92]. Могут проявлять в зависимости от условий эксперимента как анти-, так и прооксидантные свойства.	Возможно в зависимости от химической природы комплексообразователя и условий протекания реакций СРО	ЭДТА, десфероксамин, 1,10-батофенантролин, карнозин [92], изоникотиноильные соединения [99], некоторые флавоноиды [107], карведилол [172].

Даже эти немногие примеры показывают высокую вариабельность влияния комплексообразователей (как в зависимости от их химической природы, так и от условий протекания процесса СРО) на интенсивность металло-зависимых свободнорадикальных реакций. Тем не менее, на сегодняшний день проведены пока лишь единичные систематические исследования особенностей анти/прооксидантного действия комплексообразующих соединений (подробнее см. в обзорах [92, 154]).

1.2.2. Прооксидантное действие антиоксидантов

Мы уже упомянули выше, что в определенных условиях АО способны проявлять прооксидантные свойства. На сегодняшний день наличие прооксидантных свойств выявлено у аскорбиновой кислоты [10, 35, 48, 53, 158], токоферолов [6, 37, 54, 111, 181], флавоноидов [138], каротиноидов [26], глутатиона [179], куркумина [40] и некоторых других соединений.

Прооксидантное действие АО может зависеть от различных факторов: химической природы АО [92], концентрации самого АО [6, 37] или иных компонентов тест-системы [10, 35], наличия катионов металлов переходной валентности [40, 53, 54, 111, 179, 181] и т.д. Наиболее изучены особенности прооксидантного действия аскорбиновой кислоты [10, 53] и α -токоферола [6, 37].

Аскорбиновая кислота проявляет выраженное прооксидантное действие в присутствии катионов металлов переменной валентности [10, 53]. Это явление связано с высокой восстановительной активностью аскорбиновой кислоты. Катион металла переменной валентности в высшей степени окисления ($Me^{(n+1)+}$) восстанавливается аскорбиновой кислотой до Me^{n+} , который способен вовлекаться в реакции Хабера – Вейсса и Фентона [82], приводящие к образованию АФК, и катализировать разложение органических гидропероксидов с образованием свободных радикалов [92, 188, 189]. Me^{n+} окисляется до $Me^{(n+1)+}$, который затем вновь восстанавливается аскорбиновой кислотой до Me^{n+} . Образующаяся в ходе последней реакции дегидроаскорбиновая кислота также способна окислять Me^{n+} до $Me^{(n+1)+}$. Теоретически подобный цикл может продолжаться бесконечно, однако часть дегидроаскорбиновой кислоты необратимо трансформируется в 2,3-кетогулоновую кислоту и другие продукты окисления [10].

α -Токоферол способен проявлять прооксидантные свойства и в отсутствие дополнительных компонентов в реакционной среде. Феноксильные радикалы, образующиеся при реализации антиоксидантного действия токоферола, сами по себе обладают достаточной реакционной способностью, чтобы включаться в цепные реакции СРО [6, 181]. Поэтому при достаточной концентрации феноксильных радикалов в среде будет наблюдаться стимуляция, а не торможение реакций СРО под действием токоферола. Действительно, на моделях спонтанного и индуцированного окисления различных субстратов было показано, что в большинстве случаев антиоксидантное действие α -токоферола наиболее эффективно при его концентрации порядка $10^{-6} - 10^{-4}$ М. При этом отмечалось, что эффективность α -токоферола как АО тем выше, чем больше скорость образования свободных радикалов (W_i) в ходе реакций СРО [6, 37]. При более высоких концентрациях антиоксидантная активность α -токоферола снижается, а при концентрациях выше $5 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-3}$ М может проявляться прооксидантное действие α -токоферола, особенно выраженное на начальном этапе окисления [6, 37]. Возможные механизмы участия α -токоферола и продуктов его окисления в цепных реакциях СРО подробно обсуждаются в обзоре Е.Б. Бурлаковой с соавторами (1998) [6].

Кроме того, α -токоферол и его водорастворимый аналог Тролокс™ способны восстанавливать катионы Cu^{2+} до Cu^+ [54, 111], являющихся высокоэффективными инициаторами СРО [92]. Такой вариант прооксидантного действия реализуется при гораздо более низких концентрациях α -токоферола: Контуш с соавт [111] обнаружили, что липопротеины плазмы крови здоровых людей способны восстанавливать $\text{Cu}(\text{II})$ до $\text{Cu}(\text{I})$ и что эта способность связана именно с α -токоферолом. Нормальное содержание α -токоферола в плазме крови человека составляет 14 – 42 мкМ. Соответственно, прооксидантное действие α -токоферола, связанное с его восстановительной активностью, реализуется при концентрации вещества на 1–2 порядка ниже, чем прооксидантное действие, связанное с вовлечением токоферил-радикалов в реакции СРО, а значит, может играть и более существенную роль в организме.

Для β -каротина, как и для α -токоферола, было показано, что прооксидантное действие этого АО проявляется при более высоких концентрациях, чем антиоксидантное [26, 27], однако тонкий химический механизм этого явления пока не изучен.

Выше уже указана возможность проявления прооксидантных свойств АО – комплексообразователей (см. разд. 1.2.1). Таким образом, можно говорить, что прооксидантное действие присуще в определенных условиях широкому спектру АО различной химической природы, что делает изучение этой проблемы весьма актуальной.

Заметим, правда, что все эксперименты, в которых было показано прооксидантное действие АО, проводились большей частью на начальных этапах автоокисления (несколько минут – 4 часа) различных субстратов в гомогенных средах [6, 35, 37, 54, 181]. В то же время в организме процессы ПОЛ инициируются на границе раздела водной и липидной фаз и протекают главным образом в биомембранах. АО при этом работают на фоне перманентно протекающих разнообразных реакций СРО. Однако вопрос о особенностях антиоксидантного и возможности прооксидантного действия АО в мембранных модельных системах в условиях длительно (1 сут и более) протекающего окисления остается слабо изученным.

Приведенные сведения показывают, с одной стороны, важность выявления условий, способствующих проявлению АО наибольшей эффективности, с другой стороны, необходимость определения возможности прооксидантного действия изучаемых соединений. На этапе первичного скрининга наиболее удобным для выяснения указанных свойств изучаемых соединений представляется использование химических модельных систем.

1.3. Модельные системы перекисного окисления липидов для оценки антиоксидантной активности химических соединений в опытах *in vitro*

Множественность механизмов антиоксидантного действия веществ на уровне организма и, как следствие, отсутствие строгой взаимозависимости между антиоксидантными свойствами некоего вещества X в химических и в биологических тест-системах [89, 94] создает известные сложности в изучении АО: для изучения механизмов, условий и особенностей действия АО в живом организме требуется проведе-

ние экспериментов с использованием целого комплекса химических и биологических (на разных уровнях организации живой материи) экспериментов.

С другой стороны, для выявления наличия у определенной субстанции антиоксидантных свойств (первичный скрининг), а также для изучения механизма и особенностей влияния АО прямого действия на процессы СРО могут быть использованы относительно простые и доступные (био)химические тест-системы [8, 21, 89, 92].

Г.И.Клебанов с соавт. [21] указывают, что «в принципе любая методика определения антиокислительной активности основывается на использовании модельной системы, которая включает в себя по крайней мере два компонента: механизм генерации определенного сорта свободных радикалов и систему их детектирования». Однако эти авторы в своем обзоре рассмотрели исключительно модельные системы (МС) ПОЛ [21]. С другой стороны, Б.Холлиуэлл и Дж.Гатридж [94] особо подчеркивают, что при тестировании химических соединений на антиоксидантную активность важным является не только источник окислительного воздействия (*source of oxidative stress* в терминологии авторов), но и мишень окисления (способный окисляться субстрат). При таком подходе можно говорить о МС ПОЛ, МС окислительной модификации белков или нуклеиновых кислот, МС окислительной деградации полисахаридов и т.д.

Если суммировать подходы к развитию тест-систем для определения антиоксидантной активности, приведенные в работах [21, 94], то можно сказать, что любая МС, используемая для изучения влияния веществ на процессы СРО, обязательно должна содержать: (1) субстрат окисления; (2) систему генерации инициаторов процессов СРО; (3) систему детекции интенсивности процессов СРО. Для изучения конкретных мишеней и механизмов действия АО такая МС может быть дополнена компонентами селективной элиминации определенных АФК. Выше уже упоминалось, что реакции ПОЛ вносят основной вклад в процессы СРО в организме (см. разд. 1.1), поэтому именно ингибирующее действие на ПОЛ чаще всего является критерием для отбора АО, имеющих перспективу клинического использования [41, 154]. Рассмотрим подробнее компоненты и особенности применения МС в исследованиях влияния веществ на процессы ПОЛ *in vitro*, конкретно — для проведения скрининга новых АО, перспективных для клинического использования.

1.3.1. Особенности перекисного окисления липидов

При разработке МС ПОЛ для экспериментов *in vitro*, позволяющих адекватно оценивать анти/прооксидантную активность химических соединений, необходимо решить несколько проблем, связанных с особенностью протекания реакций ПОЛ, а именно с выбором субстрата ПОЛ, системы инициации радикальных реакций и способа оценки интенсивности ПОЛ. В первую очередь следует подчеркнуть, что субстратом реакций ПОЛ в организме являются в первую очередь липофильные соединения, локализованные в мембранах и иных липидных структурах, инициаторами — гидрофильные АФК, а в дальнейшем развитии процесса могут принимать участие промежуточные липофильные радикальные продукты ПОЛ.

В процессе ПОЛ окислительной модификации в первую очередь подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) и их остатки в составе сложных липидов, а холестерин и его производные окисляются со значительно меньшей скоростью. Механизм протекания отдельных реакций ПОЛ достаточно подробно изучен и описан в соответствующих статьях и монографиях [16, 37, 92, 95, 147, 180] (рис. 1).

В ходе реакций ПОЛ образуется широкий спектр продуктов — *промежуточные* (алкильные, алкоксильные и перокси-радикалы, гидропероксиды), *вторичные* (эпоксиды, эндопероксиды, конъюгированные диены и триены, карбонильные соединения) и *конечные* (продукты рекомбинации радикалов, аддукты альдегидов с биополимерами, спирты, простые эфиры, углеводороды). При этом важно отметить, что соотношение между различными продуктами, образующимися в ходе ПОЛ, зависит от интенсивности и условий протекания самого процесса и от соотношения различных субстратов ПОЛ. Так, при образовании гидропероксидов ПНЖК термодинамически наиболее выгодно присоединение кислорода к крайним атомам пентадиенильного радикала, но возможно, в зависимости от условий протекания процесса, образование и других изомерных гидропероксидов [147, 180]. Реакции образования конъюгированных диенов (составляющих основную часть экстрагируемых органическими растворителями «диеновых конъюгатов») могут иметь существенное значение лишь в условиях недостатка кислорода [92].

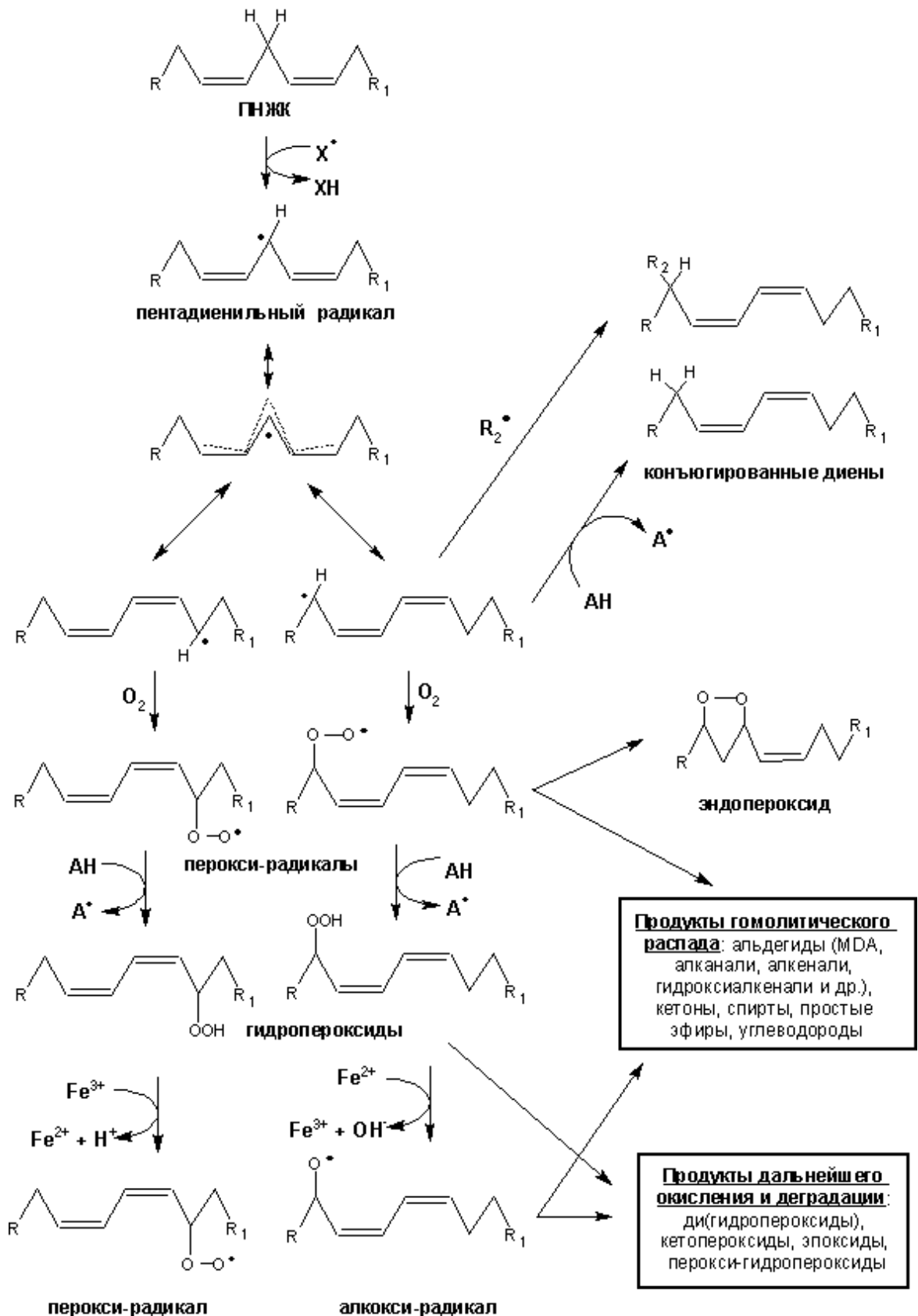


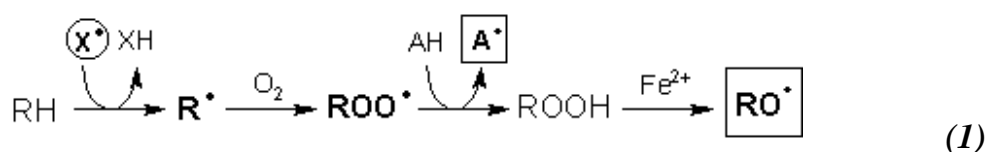
Рисунок 1. Общая схема молекулярного механизма перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (на основе сведений из [92, 95, 147]).

Промежуточные продукты ПОЛ являются относительно неустойчивыми соединениями – как радикальные, так и нерадикальные (гидропероксиды). Гидропероксид ПНЖК под действием катионов железа или других металлов переходной валентности может, в зависимости от условий, окисляться вновь до перокси-радикала или восстанавливаться до алкокси-радикала [37, 95, 147, 180]. Оба вида радикалов способны вновь вовлекаться в реакции ПОЛ.

Кроме того, гидропероксиды в ходе ПОЛ интенсивно деградируют с образованием продуктов дальнейшего окисления. В первую очередь это характерно для гидропероксидов и алкокси-радикалов, происходящих из ПНЖК, содержащих 4 и более двойных связей [95, 147, 180].

Основная часть перокси-радикалов ПНЖК, а также существенная часть алкокси-радикалов подвергаются гомолитическому распаду, давая многочисленные (идентифицировано более 50 индивидуальных соединений) стабильные вторичные и конечные продукты ПОЛ, часть из которых (например, карбонильные соединения) обладают высокой реакционной способностью и токсичностью для живых организмов [95, 147, 180].

Говоря об особенностях протекания процессов ПОЛ особенно необходимо подчеркнуть, что процесс ПОЛ может самоусиливаться по механизму цепной реакции: если на инициацию процесса перекисного окисления молекулы ПНЖК затрачивается один радикал, то в процессе окисления этой молекулы может образоваться в конечном итоге 2 свободных радикала:



каждый из которых может инициировать окисление новых молекул ПНЖК.

Рассмотренные особенности протекания реакций ПОЛ следует учитывать при выборе состава и условий использования МС ПОЛ в определенных целях.

1.3.2. Субстраты для модельных систем перекисного окисления липидов

Выбор различных видов субстратов ПОЛ для использования в МС достаточно велик, при этом практически каждый вариант обладает характерным спектром досто-

инств и недостатков (табл. 2). Для использования в МС ПОЛ для первичного скрининга АО субстрат ПОЛ должен обладать следующими свойствами:

- Постоянство (неизменность) липидного состава от препарата к препарату. Даже не очень значительные отличия в составе липидов в двух однотипных препаратах может приводить к различиям в полученных результатах (см. например, [6]).
- Возможность подбора строго определенного состава (не только липидный, но и иных компонентов) и варьирования его. Подобное свойство субстрата ПОЛ в МС обеспечивает возможность изучения особенностей действия АО в зависимости от изменения состава МС [94].
- Состав несущей фазы, в которой находятся липиды. Важность этого фактора определяется, во-первых, тем что в водной и органической фазе действие одного и того же АО может отличаться весьма значительно [37], а, во-вторых, тем, что в организме большинство реакций ПОЛ протекает в толще липидного бислоя, ограниченного с обеих сторон водной фазой [95, 180]. Лишь незначительная часть липидов в организме находится в составе немембранных белок-липидных структур (липопротеины) [22].
- Относительная простота и малая трудоемкость процедур приготовления обеспечивает возможность и удобство постановки масштабных тест-экспериментов.

Перечисленным свойствам в наибольшей степени удовлетворяют искусственные мембраны, в частности, липосомы. Липосомы представляют собой липидные бислои-ные структуры, в определенном приближении аналогичные бислою биомембран, а сферическая форма липосомальной мембраны похожа на интактные природные мембраны [30]. Приготовление липосом относительно несложно (например, в сравнении с получением препаратов природных мембран) [28]. К настоящему времени разработаны и апробированы общеупотребимые процедуры приготовления липосом, а многие липиды из природных источников являются широкодоступными коммерческими препаратами [28]. Экспериментатор может подбирать строго определенный состав МС (не только липидный, но и иных компонентов), наиболее подходящий для решения конкретной исследовательской задачи. Возможность варьирования состава искусственных мембран может позволить выявить особенности действия АО на процессы ПОЛ в зависимости от химического состава и физической структуры мембран.

Таблица 2

Субстраты перекисного окисления липидов, применение которых возможно в модельных тест-системах для изучения антиоксидантной активности веществ

Субстрат ПОЛ	Особенности применения	Литература
Эфиры ненасыщенных жирных кислот	Легкость подготовки к использованию. Позволяют исследовать влияние на интенсивность ПОЛ вариаций химической структуры субстрата окисления в гомологических рядах ПНЖК. Слабое сходство с естественными субстратами ПОЛ в организме.	[37]
Растворы липидов в органических растворителях	Удобство приготовления. Широко применялись в начальный период изучения процессов ПОЛ. Мало подходят для имитации процессов ПОЛ, инициируемых в живых организмах гидрофильными АФК.	[37]
Растворы липидов в гомогенных водно-органических фазах	Удобство приготовления. Возможность использования гидрофильных инициаторов ПОЛ. Отсутствие сходства с какой-либо средой организма (липидной или водной).	[37]
Суспензии или эмульсии липидов в водной фазе	Напоминают состав некоторых отдельных компартментов клеток и тканей организмов. Присутствует граница раздела фаз. Требуют добавления эмульгаторов, способных в значительной степени модифицировать как само протекание реакций ПОЛ, так и эффект исследуемого АО.	[6, 37]

Субстрат ПОЛ	Особенности применения	Литература
Мицеллы липидов в водной фазе и обращенные мицеллы липидов в неполярных растворителях	Отработаны стандартизированные методы получения. Хорошо подходят для изучения компартиментализации исследуемого вещества или его влияния на компартиментализацию субстратов и продуктов ПОЛ из водной внутрь липидной фазы. Отсутствует липидный бислой. Присутствие детергента может влиять на протекание процесса ПОЛ и эффект исследуемого вещества.	[181]
Липопротеины	Существуют общеупотребимые методы выделения и использования в МС ПОЛ. Чаще всего используются ЛНП плазмы крови млекопитающих. Естественный субстрат ПОЛ в организме. Характерно существенное непостоянство состава. Присутствуют естественные АО, не всегда поддающиеся количественному учету. Наиболее удобны для оценки эффекта АО на ПОЛ компонентов плазмы крови.	[20, 22, 111, 156, 163]
Липидные монослои (пленки Ленгмюра – Блоджетт)	Достаточно длительный срок жизни монослоя. Могли бы быть использованы для выяснения параллелей между влиянием АО на интенсивность ПОЛ и изменениями физических свойств монослоя, которые характеризуют поверхностную активность компонентов монослоя, взаимодействие компонентов между собой, особенности поведения и характера упаковки липидных молекул в монослое в процессе ПОЛ. Сложность аппаратуры для получения монослоев. Трудоемкость приготовления.	Нет данных по применению в исследованиях ПОЛ

Субстрат ПОЛ	Особенности применения	Литература
Препараты природных мембран	Содержат липидный бислой с характерным для конкретных органов и тканей организма составом липидов. Непостоянство липидного и жирнокислотного состава. Присутствуют естественные АО, не всегда поддающиеся количественному учету. Сложность и трудоемкость получения.	[34, 38]
– микросомы	Артефакт разделения субклеточных компонентов. Для индукции ПОЛ применимы неферментативная и ферментативная продукция АФК. При NADPH-зависимой инициации ПОЛ возможна цитохром Р450-зависимая модификация исследуемого вещества. Могут быть использованы для выявления антиоксидантной активности цитохром Р450-зависимых метаболитов исследуемого вещества ² . При ферментативной индукции ПОЛ скорость продукции АФК может существенно ($\pm 30\%$) изменяться в зависимости от степени фосфорилирования цитохрома Р450.	[105, 167]
– мембраны митохондрий	Позволяют изучать процессы ПОЛ при индукции АФК, образующимся при работе дыхательной цепи.	[3, 25]
– плазматические мембраны	Обычно применяют для исследования естественных липофильных АО. Чаще всего используются мембраны клеток крови.	[125, 155]

² Если анти/прооксидантное действие не свойственно самому веществу и свойственно его метаболитам, то изменение интенсивности СРО будет наблюдаться при инициации СРО NADPH и не будет наблюдаться при инициации системой металл + аскорбат.

Субстрат ПОЛ	Особенности применения	Литература
Искусственные мембраны	Постоянство состава, определяемого экспериментатором. Возможность варьирования состава в широких пределах. Относительная простота приготовления. Наличие общепризнанных процедур приготовления.	[28]
– плоские бислойные мембраны	Высокая механическая прочность, эластичность, устойчивость к кратковременному действию сильного электрического поля. Относительная несложность встраивания в мембрану белков. Относительная трудоемкость получения. Невысокая стабильность (от нескольких минут до 3 ч).	[30]
– липосомы	Липидный бислой подобен бислою биомембран. Простота и хорошая отработанность процедур приготовления. Высокая стабильность (до нескольких месяцев). Относительная несложность встраивания в мембрану белков (протеолипосомы). Дороговизна получения многокомпонентных липосом с липидным составом, близким к природным мембранам.	[9, 28, 30, 46, 145, 172]

Особенно важно, что суспензия липосом, используемая как субстрат ПОЛ в МС, позволяет изучать как липофильные, так и гидрофильные АО. Используя липосомы в качестве субстрата МС ПОЛ, в опытах с гидрофильными АО появляется возможность изучить как эффективность АО, находящихся в окружающей липосомы среде, так и эффективность защитного действия АО, включенных внутрь липосом.

Отдельно следует остановиться на достоинствах и недостатках способов получения липосом в аспекте их применимости в исследованиях ПОЛ (табл. 3).

Таблица 3

Свойства полученных различными способами липосом (по данным из [28])

Способ получения	Достоинства	Недостатки
Ультразвуковая обработка	Хорошо отработанный протокол процедуры приготовления. Наиболее широко используется.	Значительное окисление и гидролиз липидов в процессе озвучивания. Загрязнение препарата частицами Ti, способными стимулировать ПОЛ.
Детергентный диализ	Не стимулирует ПОЛ. Не требует специального оборудования.	Невозможность полного удаления детергента, следовые количества которого могут модифицировать влияние исследуемого вещества на ПОЛ.
Инъекция	Не стимулирует ПОЛ при получении. Не требует специального оборудования. Простота, быстрота и низкая трудоемкость получения.	Большой разброс размеров липосом в препарате, чем при экструзии. Малый объем включения. Наличие в препарате остаточных количеств растворителя.
Экструзия	Более высокая стабильность, чем у озвученных липосом. Не стимулирует ПОЛ при получении. Малый разброс размеров липосом.	Мелкие (10–50 нм) липосомы. Малый объем включения. Высокая стоимость специального оборудования.

В работах по изучению процессов ПОЛ чаще всего используют мелкие (до 100 нм) однослойные липосомы [9, 145, 172]. Многие исследователи применяют липосомы, полученные ультразвуковой обработкой суспензии липида [9, 172]. Однако эти препараты содержат существенное количество окисленных в ходе получения липосом липидов [28]. Наиболее подходящими способами получения мелких однослойных липосом для МС ПОЛ являются метод экструзии водной суспензии фосфолипида и метод инъекции в водную среду раствора фосфолипида в летучем органическом растворителе (чаще всего в этаноле) [28, 46], которые практически исключают стимуляцию ПОЛ на этапе приготовления липосом. Последний метод имеет определенные преимущества при первичном скрининге, поскольку не требует наличия дорогостоящего оборудования и специально обученного персонала, позволяя при этом легко и быстро готовить препараты малоокисленных липосом.

1.3.3. Способы инициации перекисного окисления липидов в модельных системах

При решении вопроса об использовании в МС того или иного способа инициации ПОЛ важным представляется учитывать, насколько спектр образующихся инициаторов ПОЛ соответствует таковому в живом организме. Особенно это важно при скрининге АО, перспективных для клинического применения. Другими существенными аспектами выбора являются простота подготовки системы инициации, стабильность компонентов и удобство использования в масштабных серийных экспериментах.

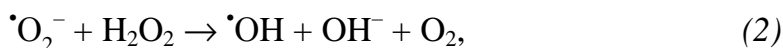
В организме реакции СРО инициируются главным образом под действием синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, супероксид-анион-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$), гидроксил-радикала ($\cdot\text{OH}$), пероксида водорода (H_2O_2) и пероксинитрита (ONOO^-) [60, 92, 162, 180].

Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ хотя и обладает высокой электрофильной активностью и химической реакционной способностью [77, 92], однако, по-видимому, единственным процессом, в развитии которого в живых организмах $^1\text{O}_2$ играет ключевую роль, является фотосенсибилизированное окисление [166].

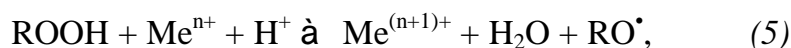
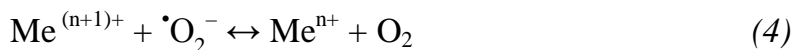
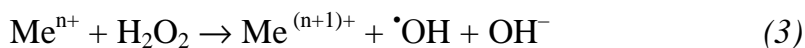
Супероксид-анион-радикал $\cdot\text{O}_2^-$ обладает высокой химической активностью [75, 76], а в условиях протонирования претерпевает превращение в гидропероксид-

радикал (HO_2^\bullet), еще более эффективный в отношении стимуляции ПОЛ, чем собственно O_2^\bullet [92].

Гидроксил-радикал OH^\bullet чрезвычайно реакционноспособен и способен наиболее эффективно из всех АФК инициировать ПОЛ [92, 95]. OH^\bullet с высокой скоростью образуется (как *in vitro*, так и *in vivo*) в ходе катализируемой металлами переходной валентности реакции Хабера – Вейсса [88]:



и в ходе реакции Фентона и сопряженных с ней реакций (в реакции могут вовлекаться катионы переходных металлов в низшей степени окисления Me^{n+} : Fe^{2+} , Cu^+ , Ti^{3+} , Cr^{2+} , Co^{2+}) [82, 183]:



Пероксид водорода H_2O_2 способен свободно диффундировать через клеточные мембраны [92]. В то же время реакционноспособность и, соответственно, прямая токсичность H_2O_2 весьма невысока, что связано в первую очередь с отсутствием в молекуле H_2O_2 неспаренных электронов. Сам по себе H_2O_2 обладает весьма слабой способностью инициировать ПОЛ [92, 95, 180].

Пероксинитрит ONOO^- [84, 169], образующийся при взаимодействии O_2^\bullet с оксидом азота NO^\bullet [108]:



сравним по реакционноспособности с OH^\bullet и легко окисляет липиды (константа скорости реакции 10^4 – $10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{сек}^{-1}$) [84, 103]. В отличие от OH^\bullet , пероксинитрит способен с высокой скоростью проникать через липидные мембраны [63, 121].

Для инициации ПОЛ в МС было предложено большое количество различных физических и химических способов (табл. 4).

Способы инициации перекисного окисления в модельных системах *in vitro*

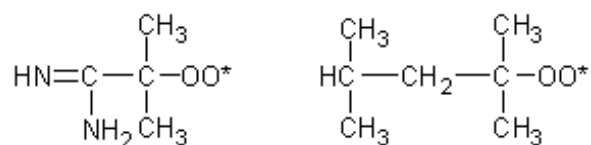
Фактор (система) инициации ПОЛ	Комментарий	Литература
Физические способы инициации		
Температурное воздействие	Обычно рассматривается как автоокисление (спонтанное ПОЛ).	[37]
Ионизирующее излучение	Обычно используется только в радиобиологических экспериментах	[167]
Ультрафиолетовое излучение	Часто используется как компонент фотохимической системы инициации	[2, 181]
Химические способы инициации		
Реактив Фентона ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$; $\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$)	Образуется главным образом $\cdot\text{OH}$ (см. разд. 1.1). Один из наиболее широко используемых инициаторов ПОЛ.	[82, 99, 137]
Cu^{2+}	Чаще всего применяется в экспериментах на липопротеинах плазмы крови. Обычно используется сульфат меди (II).	[25, 142]
Fe^{2+} или Fe^{3+} + аскорбат	Вместо железа могут быть использованы катионы и других металлов переходной валентности. Часто используется для инициации ПОЛ в микросомах. Добавление ЭДТА или ADP усиливает продукцию АФК.	[35, 57, 82, 105]
Комплекс Fe – хелатор-прооксидант	В качестве хелатора в этой системе могут быть использованы нитрилотриуксусная кислота или 8-гидроксихинолин.	[56, 92]
Дiazosоединения	При термическом разложении с постоянной скоростью образуются перокси-радикалы.	[21, 92, 175]

Фактор (система) инициации ПОЛ	Комментарий	Литература
Органические гидропероксиды	При разложении гидропероксидов образуются свободные радикалы. Чаще всего используются гидропероксиды <i>трет</i> -бутила и ПНЖК.	[136, 188, 189]
Ксантинооксидаза + субстрат	Окисление субстрата сопровождается как 1-, так и 2-электронным восстановлением O_2 (до $\cdot O_2^-$ и H_2O_2 соответственно). Повышение концентрации O_2 и снижение концентрации субстрата сдвигает равновесие в сторону образования $\cdot O_2^-$. При окислении высокооборотных субстратов (ксантин, ацетальдегид) образуется смесь $\cdot O_2^-$ и H_2O_2 , низкооборотных субстратов (люмазин) — преимущественно $\cdot O_2^-$. Продукция АФК может быть усилена добавлением люцигенина или Fe^{2+} .	[99, 114, 119, 133]
Ферментативное окисление NADPH	Инициация ПОЛ в микросомах (цитохром P450-зависимая продукция АФК).	[167]
NADH + феназинметосульфат (ФМС) + нитросиний тетразолий (НСТ)	При аэробной инкубации $\cdot O_2^-$ образуется в ходе восстановления НСТ. Молекулярный кислород снижает скорость восстановления НСТ под действием $\cdot O_2^-$. Восстановленная форма ФМС способна восстанавливать $\cdot O_2^-$.	[58, 143, 195]

Анализ литературы показал, что в современных исследованиях инициацию ПОЛ в МС чаще всего осуществляют с использованием реактива Фентона ($Fe^{2+} + H_2O_2$), солей Cu^{2+} (часто — в присутствии H_2O_2), диазосоединений, ксантинооксидазы [92, 95, 162].

Достоинством использования диазосоединений, например 2,2'-азобис-(2,4-диметилвалеронитрил) и 2,2'-азобис-(2-амидинопропана) гидрохлорида, является по-

стоянная скорость продукции перокси-радикалов, способных инициировать ПОЛ [92]. Однако по химической структуре образующиеся радикалы:



не сходны с каким-либо из физиологически важных инициаторов ПОЛ.

В ксантиноксидазной реакции продуцируется спектр физиологически важных инициаторов ПОЛ ($\dot{\text{O}}_2^-$ и H_2O_2) [95], однако использование данной системы для МС с длительным периодом ПОЛ ограничено белковой природой ксантиноксидазы. При длительной инкубации белок будет постепенно инактивироваться, а при радикальном окислении белка могут образовываться продукты, interfering в методах определения продуктов ПОЛ. Кроме того, скорость продукции инициаторов ПОЛ в ксантиноксидазной системе будет резко снижаться по мере выработки субстрата.

Реактив Фентона ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) наиболее широко применяется в МС для инициации ПОЛ. Недостатками является низкая константа скорости реакции второго порядка между Fe^{2+} и H_2O_2 , равная $76 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [92], и нестабильность Fe^{2+} в растворах, предопределяющая использование растворов солей железа (II), приготовленных *ex tempore*, а это создает определенные сложности при проведении повторных серийных опытов.

Константа скорости реакции продукции АФК при взаимодействии солей Cu^{2+} с H_2O_2 гораздо выше: $4,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [92]. Растворы солей Cu^{2+} стабильны, и в ходе всего исследования может быть использован однажды приготовленный реактив.

Часть исследователей выражает сомнение в возможности участия меди в инициации ПОЛ в живом организме. Действительно, внутри живых клеток Cu^{2+} , видимо, отсутствует в свободном (несвязанном с белками) состоянии [149]. В последние несколько лет, тем не менее, появились данные, позволяющие обоснованно предполагать вовлеченность Cu^{2+} в инициацию СРО [54, 55, 67, 111, 161]: с одной стороны, существенная часть меди в клетках находится в виде связанной с белками меди (I), с другой стороны, различные вещества, включая естественные метаболиты, оказались способны высвободить катионы меди из комплексов с белками. Таким образом, медь сейчас вновь рассматривается как возможный естественный стимулятор ПОЛ *in vivo*, роль которого особенно важна при некоторых патологиях человека [55, 161].

При инициации ПОЛ в МС с периодом окисления более 1 часа, в частности при окислении ЛНП плазмы крови человека, в качестве источника Cu^{2+} обычно используют сульфат меди в концентрациях от 10 мкМ до 5 мМ, причем в МС ПОЛ на основе липосом чаще всего применяют концентрации Cu^{2+} порядка нескольких мМ, поскольку фосфолипидные липосомы относительно более устойчивы к окислению, чем интактные мембраны тканей животных [120].

Приведенные выше данные позволяют рассматривать соли Cu^{2+} , особенно в системе $\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$, как эффективные инициаторы ПОЛ, удобные для использования в МС, предназначенных для скрининга антиоксидантов.

1.3.4. Индикация интенсивности процессов свободнорадикального окисления липидов в модельных системах

Интенсивность СРО принципиально можно оценивать двояким образом: по скорости продукции свободных радикалов (O_2^- , OH и радикальных промежуточных продуктов СРО, например, тиольных или нитроксильных радикалов) и по образованию стабильных (нерадикальных) продуктов СРО.

Первый из этих подходов при использовании ряда методов позволяет осуществить динамическую регистрацию уровня свободных радикалов в МС. Для этого обычно применяют ЭПР-спектроскопию с использованием спиновых ловушек радикалов [36, 102, 124, 168, 179] и электрохимический анализ с селективными электродами [173]. Важным достоинством этих методов наряду с динамической регистрацией является возможность выявления видов образующихся радикалов и, соответственно, выяснения молекулярных механизмов действия АО.

Многие авторы используют для оценки интенсивности СРО определение уровня хемилюминесценции (ХЛ) [4, 8, 18]. Анализ результатов, полученных методом ХЛ, позволяет выделить несколько интегральных показателей характеризующих течение процесса СРО и влияние на него исследуемого вещества [8]. Тем не менее интерпретация кривых ХЛ достаточно сложна и не всегда адекватна реальному содержанию изучаемого процесса. Кроме того, для повышения квантового выхода ХЛ широко применяют химические усилители (например, люминол), которые сами вступают в реакцию с АФК или другими радикалами с образованием активно излучающего со-

единения [8, 159]. Использование химических усилителей ХЛ повышает чувствительность метода, но в этом случае нельзя исключить влияния побочных реакций компонентов аналитической системы на результаты анализа [129].

Рассмотренные методы, кроме прочего, требуют применения специального достаточно дорогостоящего и сложного в эксплуатации оборудования, что, вместе с определенной сложностью интерпретации получаемых результатов, делает упомянутые методы мало подходящими для широкомасштабных скрининговых экспериментов. Кроме того, методы определения концентрации радикалов не позволяют выяснить, в какой степени эффект исследуемого АО сказывается на предотвращении накопления в ходе ПОЛ вторичных и конечных нерадикальных продуктов ПОЛ, то есть тех самых соединений, которые играют существенную роль в реализации в живом организме токсического действия процессов СРО [42, 92, 95].

Для оценки интенсивности ПОЛ по накоплению нерадикальных продуктов также было предложено большое количество методов [65, 69, 91], из которых мы рассмотрели наиболее широко применимые или перспективные современные аналитические методы, подходящие для использования в МС *in vitro* (табл. 5).

Карбонильные соединения являются одной из основных групп продуктов ПОЛ как в живых организмах, так и *in vitro* [37, 92, 95, 162, 180]. В сравнении с гидропероксидами липидов (ГПЛ) карбонильные соединения более стабильны и мало подвергаются дальнейшей деградации в условиях МС *in vitro*. Кроме того, карбонильные продукты, в первую очередь, МДА и гидроксиалкены, являются в организме одними из наиболее токсичных продуктов ПОЛ (действующие концентрации порядка нескольких нМ) [42, 65, 95]. Поэтому влияние веществ на накопление в ходе ПОЛ карбонильных соединений представляет несомненный интерес в ходе поиска новых АО, имеющих перспективу клинического применения.

Таблица 5

Определение нерадикальных продуктов перекисного окисления липидов в модельных системах

Продукты ПОЛ	Метод *	Комментарий	Литература
Ненасыщенные жирные кислоты (уменьшение содержания)	ГЖХ, ВЭЖХ	Широко применяется при исследованиях ПОЛ, стимулированного металлами, когда образуется широкий спектр продуктов окисления.	[91]
Гидропероксиды липидов (ГПЛ)	УФ-СФ	Требуется предварительная экстракция. Весьма малочувствительный и неспецифичный метод.	[108]
	Т, Ф	ГПЛ окисляют Г до I ₂ , содержание которого может быть определено фотометрически или титрованием с тиосульфатом. Позволяет определять ГПЛ в присутствии эндопероксидов. Определению мешают H ₂ O ₂ и другие окислители, легко окисляющиеся вещества (например, меркаптаны) и вещества, реагирующие с I ₂ (например, ацетон).	[91, 148]
	Катализ + Ф или ХЛ	Гемопротеины разрушают ГПЛ. Образующиеся радикалы детектируются по ХЛ изолюминола или по изменению окраски редокс-чувствительных индикаторов. Чувствительность 1 нМ.	[91]

Продукты ПОЛ	Метод *	Комментарий	Литература
Гидропероксиды липидов (ГПЛ)	Ферм	Глутатионпероксидаза, микропероксидаза, пероксидаза хрена и гемоглобин (за счет минорной пероксидазной активности) разрушают ГПЛ. Индикация по изменению окраски окисляющегося субстрата пероксидаз или убыли субстрата сопряженной ферментативной реакции. Чувствительность 3 мкМ. Не позволяет определять гидропероксиды сложных липидов.	[91, 148, 177]
	ВЭЖХ/МСп	Высокочувствительный метод, позволяющий идентифицировать индивидуальные ГПЛ. Требуется сложное оборудование и относительно долгая подготовка проб. Мало применим в серийных анализах.	[44, 112, 190]
Вещества, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ВР-ТБК)	Ф, Фл	Некоторые продукты ПОЛ при нагревании в кислой среде образуют с ТБК окрашенные и флуоресцирующие соединения. Основная часть <i>ВР-ТБК</i> образуется из ГПЛ и неокисленных ПНЖК в ходе самого анализа. Широко применяемый и относительно простой, но неспецифичный метод. Многие вещества, не являющиеся продуктами ПОЛ, способны реагировать с ТБК.	[91, 92, 148, 191]
Альдегиды	Ф, Фл	Одни из основных продуктов ПОЛ (алканали, алкенали, гидроксипалкенали, МДА и др.). Обладают высокой цитотоксичностью. В настоящее время разработан ряд чувствительных и специфичных фо-	[65, 72, 91, 146, 152]

Продукты ПОЛ	Метод *	Комментарий	Литература
		то- и флуорометрических методов анализа, однако многие из них требуют умеренного нагревания анализируемой пробы в кислой среде, что может приводить к образованию дополнительных количеств альдегидов в ходе анализа.	
Карбонильные соединения	Ф/ТСХ	Кроме альдегидов, при ПОЛ могут образовываться кетосоединения. Сумма карбонильных продуктов может быть определена фотометрически с использованием ДНФГ. Производные карбонильных продуктов ПОЛ с ДНФГ могут быть разделены хроматографически на индивидуальные соединения. Простой, легкий в выполнении, специфичный метод анализа, не требующий нагревания пробы в ходе анализа.	[24, 65, 70]
	ГХ/ВЭЖХ/М Сп	Высокочувствительный метод (< 1 нМ), позволяющий идентифицировать индивидуальные карбонильные продукты ПОЛ. Требует сложного оборудования и относительно долгой подготовки проб. Мало применим в серийных анализах.	[68, 71, 164, 165, 178]
Конъюгированные диены и триены	УФ-СФ	Образуются в ходе ПОЛ в первую очередь при недостатке O ₂ в реакционной среде. Имеют характерные пики поглощения (220–240 нм для диенов и 270–285 нм для триенов). Обычно требуется предвари-	[32, 92, 109, 148, 175]

Продукты ПОЛ	Метод *	Комментарий	Литература
		тельная экстракция органическими растворителями. Относительно простой метод анализа. Чувствительность и специфичность невысокие, но могут быть повышены применением анализа производных спектров. Многие «экстрагируемые диены» из природных субстратов ПОЛ не являются продуктами ПОЛ.	
Изопростаны	ВЭЖХ	Группа простагландин-подобных соединений, образующихся из арахидоновой кислоты в процессе ПОЛ <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> . Чувствительный маркер мягкого окисления ПНЖК, когда другие продукты ПОЛ еще не образуются в значимых количествах.	[65, 116]
Углеводороды	ГХ	Минорные конечные продукты ПОЛ. В основном образуются пентан и этан. Декомпозиция ГПЛ с выделением углеводородов зависит от концентрации присутствующих в реакционной среде катионов металлов.	[65, 91, 115, 131]

* Сокращенные обозначения методов: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГЖХ – газожидкостная хроматография; ГХ – газовая хроматография; МСп – масс-спектрометрия; Т – титриметрия; ТСХ – тонкослойная хроматография; УФ-СФ – спектрофотометрия в ультрафиолетовой области спектра; Ф – фотометрия в видимой области спектра; Ферм – ферментативный метод анализа; Фл – флуориметрия.

При выборе конкретного метода анализа карбонильных продуктов ПОЛ постоянно приходится балансировать между точностью и чувствительностью, с одной стороны, и доступностью и применимостью к анализу серийных проб, с другой. Фотометрические и флуориметрические методы отличаются меньшей чувствительностью и специфичностью, чем хроматографические методы и масс-спектропия, однако вследствие своей простоты гораздо более удобны для первичного тестирования веществ на наличие анти/прооксидантной активности.

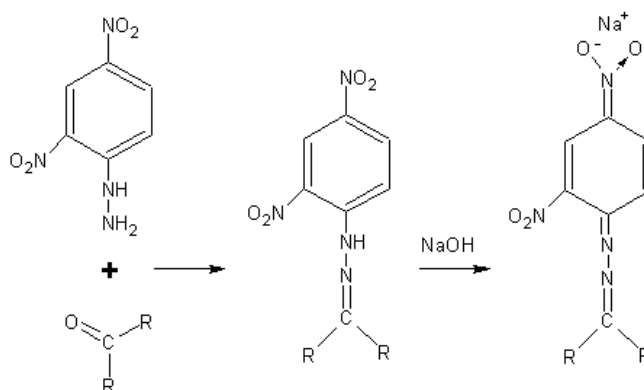
Совершенно очевидно, что способ оценки интенсивности ПОЛ в МС для исследований по скринингу АО, которые предполагают проведение большого числа повторных серийных опытов, должен быть прост и удобен в применении, требовать минимальных затрат времени на проведение анализа и обеспечивать возможность одновременного анализа большого числа образцов. Наряду с этим соответствующий аналитический метод должен обладать высокой специфичностью, достаточной для обнаружения малых изменений уровня ПОЛ чувствительностью и хорошей воспроизводимостью для получения статистически достоверных результатов при разумном числе повторностей опытов.

Приведенным требованиям в достаточной степени удовлетворяют колориметрические методы определения концентрации карбонильных продуктов ПОЛ. Эта группа методов обладает более низкой чувствительностью и специфичностью, чем определение индивидуальных продуктов ПОЛ с использованием ВЭЖХ и масс-спектропии. Тем не менее, колориметрические методы достаточно просты в исполнении, не требуют наличия сложного оборудования и больших затрат времени на подготовку и выполнение, легко адаптируются для проведения масштабных серийных опытов, а их чувствительность вполне приемлема для оценки уровня ПОЛ в МС.

Из упомянутой группы методов наиболее широко используется определение веществ, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ВР-ТБК). Этот метод, однако, отличается недостаточной специфичностью, а существенная часть ВР-ТБК образуется в анализируемой пробе в ходе самой аналитической процедуры [70, 72].

Одним из специфических реактивов на вещества с карбонильной группой является 2,4-динитрофенилгидразин (ДНФГ). ДНФГ способен реагировать с карбонильными соединениями (альдегиды и кетоны) с образованием соответствующих гидразо-

нов, которые в щелочной среде превращаются в интенсивно окрашенные *аци*-соли. Максимум поглощения последних в водной среде находится в диапазоне 410–500 нм:



Из других соединений в реакцию с ДНФГ могут вступать хиноны, но *аци*-соли их гидразонов поглощают при длинах волны 600–650 нм [24].

ДНФГ широко используется для определения содержания карбонильных групп в белках при оценке уровня окислительного повреждения белков [73, 152]. Однако для определения продуктов ПОЛ этот реактив стали применять относительно недавно. В 1977 г. Селим [164] предложил использовать ДНФГ в качестве дериватирующего агента для получения стабильных производных карбонильных продуктов ПОЛ. Затем полученные производные разделялись ВЭЖХ для идентификации следовых количеств карбонильных соединений. Данный подход был с успехом применен для определения карбонильных продуктов ПОЛ в моче лабораторных животных [68, 165]. Карбонильные продукты ПОЛ в виде динитрофенилгидразонов могут быть также разделены с использованием газовой [178] и тонкослойной хроматографии [70].

Тем не менее, нам не удалось найти в литературе примеров использования ДНФГ для количественного определения содержания суммы карбонильных продуктов ПОЛ фотометрическим способом.

Таким образом, на сегодняшний день нет сомнений в важности и актуальности поиска новых химических соединений, которые обладают антиоксидантными свойствами и на основе которых могут быть созданы лекарственные препараты, перспективные для применения в лечении таких заболеваний, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, нейродегенеративные заболевания, сосудистые осложнения при сахарном диабете, катаракта, аутоиммунные и воспалительные заболевания, заболева-

ния печени. Наибольший интерес вызывает возможность выявления АО, специфически действующих на конкретные звенья процесса СРО в целом и ПОЛ в частности. Важным при этом представляется выбор для дальнейших предклинических испытаний таких веществ, которые, наряду с высокой эффективностью антиоксидантного действия, проявляли бы минимум побочных эффектов. В частности, речь идет о способности различных АО в определенных условиях не подавлять, а, наоборот, стимулировать интенсивность реакций ПОЛ.

Однако приведенный нами анализ литературных данных демонстрирует, что прогресс в обнаружении новых, перспективных для медицинского применения АО с конкретными особенностями антиоксидантного действия в определенной степени тормозится отсутствием унифицированного подхода к выявлению у веществ различной химической природы антиоксидантных свойств. Такой подход должен, наряду с проведением первичного скрининга новых АО, обеспечивать возможность предварительного определения звеньев процесса СРО, на которые действуют испытуемые вещества, оценки условий их наиболее эффективного антиоксидантного действия, а также выявления возможности и условий его инверсии в прооксидантное действие.

В большинстве случаев основной упор в современных исследованиях делается на обнаружение веществ, непосредственно снижающих скорость реакций ПОЛ. Первичный скрининг таких веществ удобно вести в химической модельной системе. Поэтому на повестке дня стоит проблема разработки стандартной модельной системы для обнаружения и оценки особенностей антиоксидантного действия химических соединений с различными физико-химическими свойствами.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Материалы и реактивы

В работе были использованы следующие материалы: пробукол производства ICN Pharmaceuticals, Inc. (США); глутаровый альдегид производства Koch-Light (Великобритания); глутатион (восстановленная форма, GSH), ионол (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол), кверцетина дигидрат, 2-тиобарбитуровая кислота производства Merck (Германия); натрия ацетата тригидрат производства Reanal (Венгрия); дипальмитоил- α -L-лецитин производства Serva (Германия); 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES) производства Sigma (США); N-(2,4-динитрофенил)гидразин, калия-натрия тартарата тетрагидрат, меди (II) ацетата моногидрат, меди (II) сульфата пентагидрат, натрия гидроксид, натрия пируват, натрия сукцинат, соляная кислота (36,5 %), таурин, унитиол (2,3-димеркаптопропан-1-сульфонат натрия), фосфорная кислота (85 %), этанол производства «Реахим» (Россия) (квалификации х.ч. или ч.д.а.); водорода пероксид (3%-ный водный раствор) производства Ростовской фармацевтической фабрики (Россия) (концентрация H_2O_2 контролировалась спектрофотометрически при длине волны 243 нм); яичный фосфатидилхолин (10 % раствор в этаноле) производства Харьковского завода бактериальных препаратов (Украина).

Оборудование

При подготовке и проведении настоящей работы были использованы следующие виды лабораторного и аналитического оборудования: мешалка магнитная модель 1607 (LKB, Швеция); аналитические весы ОА-21 (Польша); термостат воздушный ТС-80 (Россия); спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО, Россия) с диафрагмой на входе пучка света в кюветное отделение (диаметр отверстия 1 мм); лабораторные центрифуги ОПН-3 и ОПН-8 (Россия); иономер/рН-метр И-130 (Россия); автоматические дозаторы (сэмплеры) Pipetman (Gilson, Франция) и Finnpiquette (Labsystems, Финляндия).

Изображения структурных формул химических соединений и схем последовательностей реакций создавались с использованием прикладной программы Chem-Sketch 4.55 (Advances Chemistry Development Inc., Канада; <http://www.acdlabs.com>).

Приготовление липосом

Липосомы для использования в модельных системах готовили инъекционным способом [46]. Для этого в 5 мл дистиллированной воды или соответствующего буферного раствора при постоянном интенсивном перемешивании шприцом с тонкой иглой быстро впрыскивали 0,25 мл раствора фосфолипида необходимой концентрации в этаноле. Конечная концентрация фосфолипида в суспензии липосом в большинстве экспериментов составляла 2,38 мг/мл.

Гидрофильные исследуемые вещества добавляли до нужной концентрации к водной фазе перед приготовлением липосом.

Липофильные исследуемые вещества добавляли до нужной концентрации к этанольному раствору фосфолипидов перед приготовлением липосом.

Окисление липосом

Липосомы подвергали спонтанному и индуцированному окислению при температуре 37 °С. Условия индукции окисления липосом (вещества и использованные концентрации) описаны в тексте и в подписях к соответствующим рисункам и таблицам.

Определение концентрации карбонильных соединений с использованием N-(2,4-динитрофенил)гидразина

Концентрацию карбонильных соединений в суспензии липосом определяли оригинальным методом. Для этого к 0,05 мл суспензии липосом добавляли 0,2 мл реактива А. Через 10 мин к реакционной смеси прибавляли 1 мл 0,75 М NaOH. Еще через 10 мин оптическую плотность реакционной смеси измеряли при длине волны 460 нм против соответствующим образом обработанной контрольной пробы (вода).

Реактив А. 5 мМ раствор N-(2,4-динитрофенил)гидразина (ДНФГ) в 1,9 М HCl. Для приготовления реактива требуемое количество ДНФГ суспендировали в концентрированной HCl. Через 30–60 сек к суспензии медленно при интенсивном перемешивании добавляли дистиллированную воду до получения требуемой концентрации HCl в растворе. Реактив готовили за 30–40 мин до проведения анализа.

Определение концентрации веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой

Определение в суспензии липосом концентрации веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ВР-ТБК), проводили двумя различными методами.

Метод 1. В присутствии трихлоруксусной кислоты ВР-ТБК определяли как описано в [70] с некоторыми изменениями. К 0,5 мл суспензии липосом добавляли 0,5 мл 0,92 М трихлоруксусной кислоты и 1 мл 49 мМ 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК), нагревали 15 мин на кипящей водяной бане, центрифугировали 10 мин при 3000 g, после чего надосадочную жидкость фотометрировали при длинах волн 452 и 532 нм против соответствующим образом обработанной контрольной пробы (вода).

Метод 2. Определение ВР-ТБК в присутствии фосфорной кислоты с последующей экстракцией хромофора бутанолом-1 проводили по методу Андреевой с соавт. [2] как с добавлением, так и в отсутствие FeSO_4 . К 0,15 мл суспензии липосом добавляли 0,15 мл 1 % фосфорной кислоты, 0,5 мл 0,6 % ТБК и 0,05 мл 10 мМ $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, после чего реакцию смесь инкубировали в течение 1 ч на кипящей водяной бане. После охлаждения к реакционной смеси добавляли 2 мл 1-бутанола, хорошо перемешивали и центрифугировали 10 мин при 1800×g. Супернатант отбирали и фотометрировали при длине волны 535 нм против 1-бутанола.

Определение содержания конъюгированных диенов и кротонового альдегида

Определение конъюгированных диенов проводили, как описано в работе [37]. Для этого 0,2 мл суспензии липосом экстрагировали 2 мл смеси гептан – 2-пропанол (1:1) в течение 1 мин при интенсивном встряхивании. Затем для расслоения фаз добавляли 0,2 мл воды. Через 10 мин из верхней гептановой фазы отбирали 0,2 мл, разбавляли 2 мл этанола и фотометрировали при длине волны 232 нм против этанола.

Содержание кротонового альдегида определяли фотометрией того же гептанового экстракта при длине волны 220 нм [32].

Исследованные химические соединения

В работе было исследовано влияние на процесс ПОЛ в модельной системе 7 химических соединений, входящих в состав лекарственных препаратов:

Химическое соединение	Лекарственный препарат, в состав которого входит данное соединение	Назначение лекарственного препарата
2,3-Димеркаптопропан-сульфонат натрия	Унитиол	Антидот
Ионол	Дибунол	Антиоксидант
Кверцетин	Кверцетин	Витаминоподобное средство
Пробукол	Пробукол (липомал)	Гипохолестеринемическое средство
Ретинола ацетат	Ретинола ацетат (витамин А)	Витаминное средство
Таурин	Тауфон	Регулятор метаболических процессов
Эргокальциферол	Эргокальциферол (витамин D ₂)	Витаминное средство

В работе также было исследовано действие на интенсивность ПОЛ в модельной системе важного природного антиоксиданта глутатиона и трех комплексообразующих карбоновых кислот: янтарной, лимонной и винной (естественные метаболиты; компоненты пищевых продуктов и пищевых добавок; входят в лекарственные препараты как солеобразующие анионы или вспомогательные вещества).

Выбор концентраций, в которых исследуемые вещества вносились в модельную систему, осуществлялся исходя из физиологических (для естественных метаболитов) или терапевтически достижимых (для фармакологически активных веществ) концентраций в тканях и биологических жидкостях организма человека

Оценка эффективности антиоксидантного действия

Эффективность антиоксидантного действия исследуемого химического соединения в каждой серии опытов и для каждой длительности периода окисления липосом рассчитывали по формуле:

$$[(C_0 - C_1) / C_0] \times 100 \%,$$

где C_0 – концентрация карбонильных соединений в суспензии липосом, не содержащей исследуемого соединения (контроль), C_1 – концентрация карбонильных соединений в суспензии липосом, содержащей исследуемое соединение (опыт).

Если значение показателя эффективности антиоксидантного действия было положительным, считали, что тестируемое вещество проявляет антиоксидантное действие; если значение показателя эффективности антиоксидантного действия было отрицательным, считали, что тестируемое вещество проявляет прооксидантное действие.

Статистические методы

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в [12, 39].

Статистически обработанные данные представляли в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение. Достоверность отличий между средними в различных группах опытов устанавливали с помощью дисперсионного анализа ANOVA (значение величины p в этом случае показывает вероятность достоверности нулевой гипотезы о равенстве генеральных средних). При значении $p < 0,001$ мы полагали результаты статистического анализа высоко значимыми; при $0,001 < p < 0,01$ — значимыми (достоверными); при $0,01 < p < 0,05$ — сомнительными (спорными); а при $p > 0,05$ — незначимыми.

Для оценочного выявления вида взаимосвязи между двумя показателями использовали построение диаграмм рассеяния; количественную меру степени взаимосвязи определяли с помощью численных методов (расчет коэффициента линейной корреляции Пирсона r). Для оценки линейности зависимости одного показателя от другого вычисляли уравнение линейной регрессии.

Все статистические расчеты проводили с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows, Kernel Release 5.5 А фирмы StatSoft, Inc. (США).

Глава 3. Разработка и оптимизация применения модельной системы для оценки антиоксидантного действия веществ на основе липосом

3.1. Сравнительная оценка применимости методов определения карбонильных продуктов ПОЛ с использованием тиобарбитуровой кислоты и 2,4-динитрофенилгидразина в липосомальной модельной системе

3.1.1. Применимость метода определения веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ВР-ТБК), для оценки уровня ПОЛ в модельной системе

Тиобарбитуровая кислота (ТБК) способна реагировать с широким спектром соединений, включая карбонильные. В результате образуются хромогены с максимумом поглощения при длинах волн 452 и 532 нм; второй максимум более интенсивный [70, 71]. Считается, что хромогены, поглощающие при длине волны 532 нм, образуются в первую очередь из малонового диальдегида (МДА) и родственных ему соединений [70]. Хромогены, поглощающие при длине волны 452 нм, по мнению Дрэйпера с соавт. [66], происходят из гексаналя и, вероятно, других *n*-алкеналялей. Количество образующихся хромогенов увеличивается в присутствии ионов железа [92]. Это связано с образованием в ходе самого анализа существенного количества ВР-ТБК при разложении промежуточных продуктов ПОЛ, которое катализируется ионами Fe^{2+} [37, 65, 69]. По-видимому, катионы других металлов переходной валентности могут аналогично влиять на ход рассматриваемой реакции.

Поскольку соли Fe^{2+} и Cu^{2+} широко используются при инициации ПОЛ в МС, мы изучили влияние ионов Fe^{2+} и Cu^{2+} на результаты определения содержания ВР-ТБК в суспензии липосом, подвергнутых автоокислению, в присутствии трихлоруксусной кислоты. Соли Fe^{2+} и Cu^{2+} в виде сульфатов были взяты в концентрации, соответствующей концентрации этих веществ 2,5 мМ в МС ПОЛ.

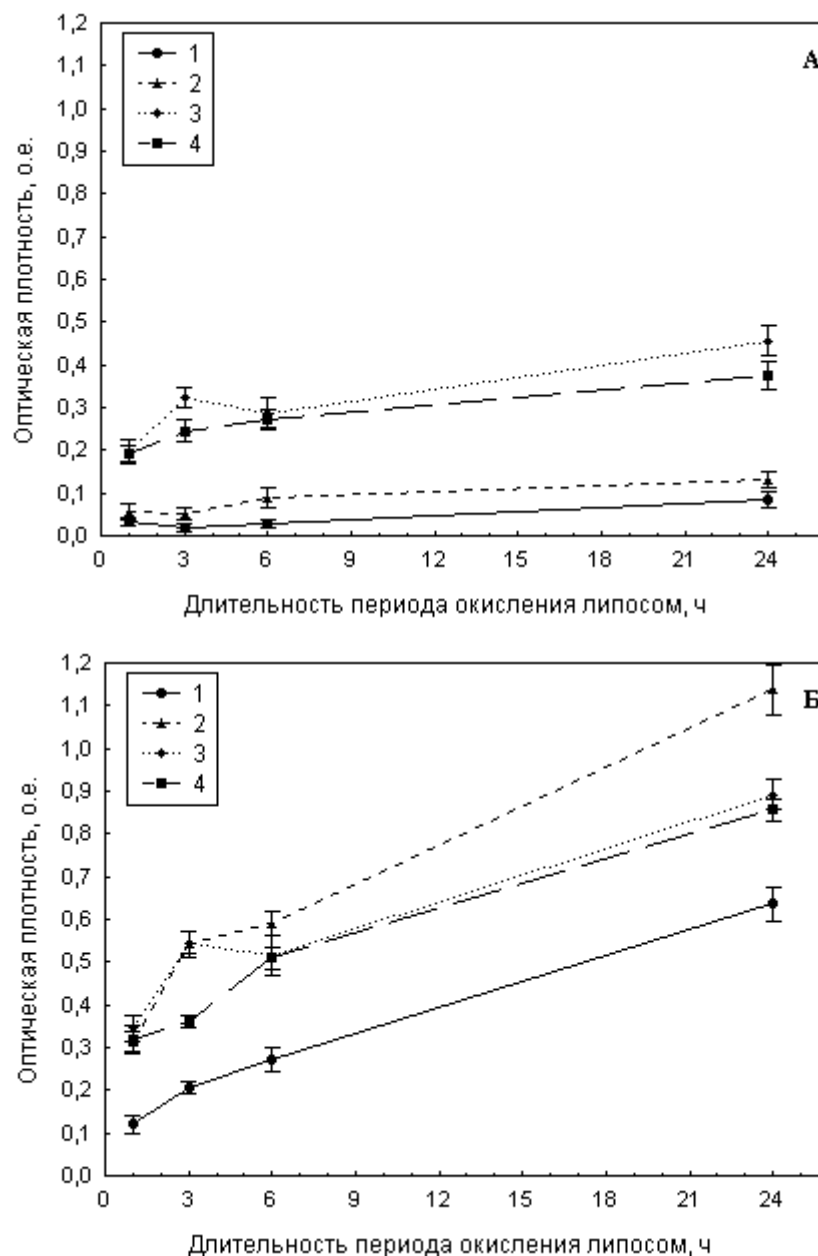


Рисунок 2. Поглощение при длинах волн 452 нм (А) и 532 нм (Б) хромогенов, образующихся при взаимодействии карбонильных соединений суспензии липосом (2,38 мг липида/мл суспензии), подвергнутых автоокислению при 37 °С, и тиобарбитуровой кислоты (*Метод 1*). 1 – в отсутствие катионов металлов; 2 – в присутствии 0,625 мМ Fe²⁺; 3 – в присутствии 0,625 мМ Cu²⁺; 4 – в присутствии 0,625 мМ Fe²⁺ и 0,625 мМ Cu²⁺. Усреднение результатов 4 экспериментов (M ± SD).

Наши эксперименты показали, что в препаратах окисленных липосом содержание ВР-ТБК, определенное в присутствии Fe²⁺ или Cu²⁺, было выше, чем уровень этих соединений, определенный в отсутствие солей металлов переходной валентности

(рис. 2). При этом в пробах, содержащих CuSO_4 , в ходе анализа наблюдалось интенсивное образование осадка красно-бурого цвета, характерного для оксида меди (I) Cu_2O . Это наблюдение может свидетельствовать о восстановлении в ходе анализа заметных количеств Cu^{2+} до Cu^I .

Ранее Бигвуд с соавт. [50] показали, что продукт взаимодействия гексаналя с $\text{N,N}'$ -диэтилбарбитуровой кислотой подвергается под действием Fe^{III} каталитической деградации с образованием особого анионного хромогена. Авторы предположили, что поглощающие при длине волны 452 нм хромогены, образующиеся из альдегидов и ТБК, имеют аналогичную природу.

Поскольку при добавлении CuSO_4 к реакционной смеси мы наблюдали образование значительного количества поглощающих при длине волны 452 нм хромогенов параллельно с восстановлением Cu^{2+} до Cu^I , можно было бы предположить, что и в нашем случае образуется хромоген, аналогичный описанному Бигвудом с соавт. [50], только в качестве катализатора выступает не Fe^{III} , а Cu^{II} . Однако сомнения в правильности этой гипотезы вызывает факт образования обильного осадка Cu_2O , в то время как предложенный Бигвудом с соавт. [50] механизм образования такого хромогена требует участия как окисленной, так и восстановленной форм металла переходной валентности.

Исходя из способности Cu^{2+} легко восстанавливаться и способности ТБК легко окисляться, мы предположили, что хромоген, поглощающий при длине волны 452 нм, может образовываться при непосредственном взаимодействии Cu^{2+} с ТБК.

Для проверки данного предположения мы сравнили дифференциальные (относительно раствора ТБК) спектры поглощения продуктов, образующихся при взаимодействии ТБК с Cu^{2+} , а также со спонтанно окисленными липосомами в отсутствие и в присутствии Cu^{2+} (рис. 3).

Из приведенных спектров видно, что интенсивное образование хромогена с максимумом поглощения на длине волны 452–453 нм происходит при взаимодействии ТБК с Cu^{2+} даже в отсутствие суспензии окисленных липосом (рис. 3, 1). При определении содержания ВР-ТБК в окисленных липосомах в отсутствие Cu^{2+} оптическая плотность реакционной смеси при длине волны 452 нм была очень низкой (рис. 3, 2). Добавление к реакционной смеси CuSO_4 стимулирует образование в ходе анализа

большого количества хромогена с максимумом поглощения 452–454 нм и повышает содержание хромогенов, поглощающих при длине волны 532 нм (рис. 3, 3).

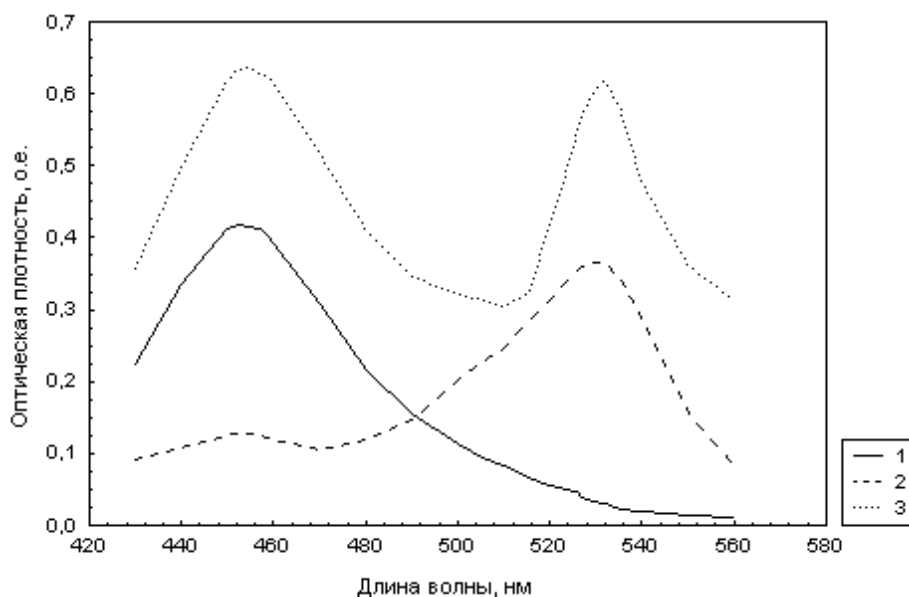


Рисунок 3. Спектры поглощения веществ, образующихся при взаимодействии тиобарбитуровой кислоты (ТБК), продуктов ПОЛ фосфатидилхолиновых липосом (2,38 мг липида/мл суспензии) и сульфата меди (II) (спектры сняты относительно раствора ТБК): 1 – ТБК + 0,625 мМ Cu^{2+} ; 2 – ТБК + липосомы после 18-часового автоокисления; 3 – ТБК + липосомы после 18-часового автоокисления + 0,625 мМ Cu^{2+} .

Исходя из этих наблюдений мы полагаем, что существенная часть образующиеся при взаимодействии суспензии окисленных липосом с ТБК в присутствии Cu^{2+} хромогенов, интенсивно поглощающих при 452 нм, продуцируется не в результате взаимодействия ТБК с продуктами ПОЛ, а при непосредственном взаимодействии ТБК с Cu^{2+} .

Полученные нами результаты свидетельствуют, что содержание ВР-ТБК не может быть достоверным показателем содержания продуктов ПОЛ в анализируемом образце, если в нем присутствуют катионы Fe^{2+} или Cu^{2+} , поскольку, с одной стороны, катионы металлов переходной валентности стимулируют образование в ходе анализа дополнительных количеств ВР-ТБК, а с другой стороны, Cu^{2+} способна непосредственно взаимодействовать с ТБК. Указанные процессы существенно искажают результаты определения концентрации продуктов ПОЛ в анализируемом образце.

Исходя из приведенных фактов, мы полагаем, что метод определения ВР-ТБК не может быть использован для оценки уровня ПОЛ в МС, если для инициации окисления используются катионы металлов переменной валентности.

3.1.2. Применимость метода определения карбонильных соединений с использованием 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) для оценки уровня ПОЛ в модельной системе

2,4-Динитрофенилгидразин (ДНФГ), в отличие от ТБК, как показали проведенные нами предварительные эксперименты, не реагирует как с различными солями Cu^{2+} (сульфат, хлорид, ацетат), так и с продуктами их реакции с H_2O_2 .

При взаимодействии с окисленными липосомами из яичного фосфатидилхолина ДНФГ приводил к образованию интенсивно окрашенных в щелочной среде продуктов красно-коричневого цвета. Если воздействию индукторов окисления подвергали липосомы из дипальмитоил- α -L-лецитина, содержащего только насыщенные жирнокислотные остатки, образования окрашенных продуктов после обработки липосом ДНФГ не наблюдалось. Этот факт подтверждает, что карбонильные соединения, реагирующие с ДНФГ, образуются в липосомах в ходе реакций ПОЛ.

В ходе оптимизации метода количественного анализа карбонильных продуктов ПОЛ с использованием ДНФГ мы столкнулись с необходимостью выбора длины волны для фотометрического измерения. Известно, что *аци*-формы динитрофенилгидразонов карбонильных соединений имеют один максимум поглощения [24]. При исследовании спектров поглощения динитрофенилгидразонов карбонильных соединений, образующихся при спонтанном и Cu^{2+} -индуцированном ПОЛ липосом мы обнаружили, что образующиеся хромогены имеют широкую полосу поглощения (рис. 4). Этот факт говорит о присутствии в окисленных липосомах по крайней мере нескольких различных карбонильных соединений, реагирующих с ДНФГ.

Важно отметить, что нами были обнаружены различия в максимумах поглощения образующихся окрашенных продуктов в зависимости от способа инициации ПОЛ липосом.

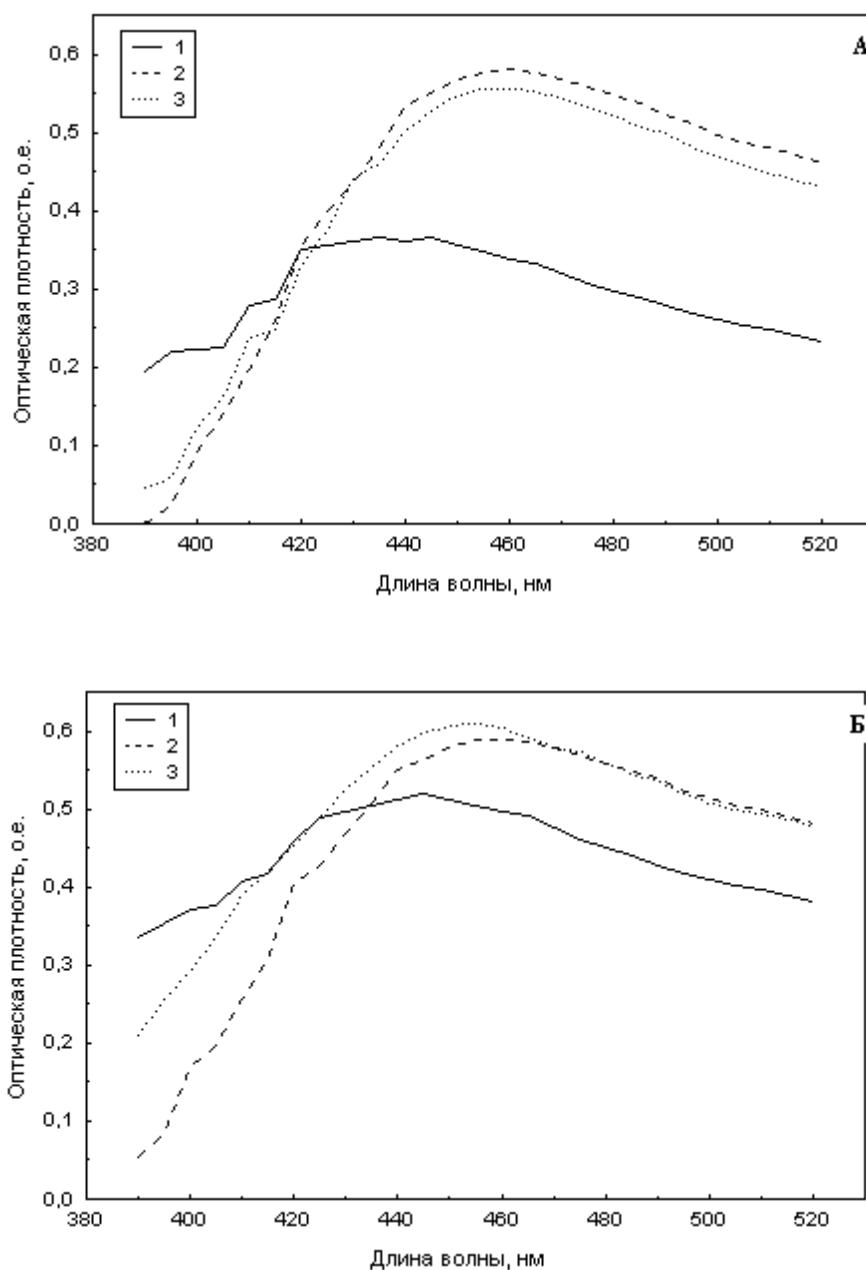


Рисунок 4. Спектр поглощения *аци*-форм продуктов взаимодействия карбонильных соединений, образующихся в ходе ПОЛ фосфатидилхолиновых липосом (2,38 мг липида/мл), с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ). Липосомы предварительно инкубировали 48 ч при 37 °С в отсутствие (А) и в присутствии H_2O_2 (Б): 1 – без добавления солей Cu^{2+} ; 2 – с добавлением CuSO_4 ; 3 – с добавлением $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Конечная концентрация Cu^{2+} в инкубационной среде составила 2,5 мМ, H_2O_2 – 0,8 мМ. Спектры сняты относительно контрольной пробы (дистиллированная вода), инкубированной с реактивами согласно методике анализа.

Спектр поглощения продуктов взаимодействия ДНФГ со спонтанно окисленными липосомами имеет максимумы при 435 и 445 нм, выраженное плечо при 415 нм и небольшое плечо при 465 нм. При индукции ПОЛ пероксидом водорода образуются карбонильные соединения, продуцирующие в ходе анализа хромогены с максимумом поглощения при 445 нм. Во всех случаях Cu^{2+} -индуцированного ПОЛ спектры образующихся в ходе анализа продуктов имеют широкий максимум при 450–470 нм и слабо выраженное плечо при 410–420 нм.

Учитывая, что 4-гидроксиноненаль, один из основных продуктов ПОЛ, образует 2,4-динитрофенилгидразон с максимумом поглощения 456 нм в щелочной среде (этанольный раствор КОН) [72], мы полагаем, что наблюдающийся нами максимум поглощения может быть связан с динитрофенилгидразонами 4-гидроксиноненала и/или других гидроксиалкеналях. Дальнейшие измерения оптической плотности реакционной смеси ДНФГ с продуктами ПОЛ мы проводили при длине волны 460 нм.

При выборе эталона для калибровки метода определения карбонильных продуктов ПОЛ возникают известные сложности: основные карбонильные продукты ПОЛ — алкеналях, алкадиеналях и гидроксиалкеналях, — являются достаточно нестабильными соединениями [70, 72] и не доступны в виде коммерческих препаратов, в то время, как доступные в виде коммерческих препаратов коротко- и среднецепочечные *n*-алканалях (бутаналь, пропаналь, гексаналь и др.) и кетоны (ацетон, ацетилацетон и др.), как правило, образуют динитрофенилгидразоны, имеющие в водных растворах щелочей максимум поглощения в диапазоне длин волн 405–440 нм [13, 24], то есть в более коротковолновой области, чем основные карбонильные продукты ПОЛ [70, 72].

После проведения серии предварительных экспериментов с различными карбонильными соединениями мы выбрали в качестве эталона для калибровки метода пировиноградную кислоту, соли которой (пируваты) являются стабильными при хранении соединениями. Динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты в условиях проведения анализа предложенным нами способом имеет максимум поглощения 440 нм, а зависимость показателей оптической плотности от концентрации конкретного вещества (в пересчете на карбонильные группы) является линейной с высокой степенью достоверности в диапазоне 0,1–2 мМ (рис. 5).

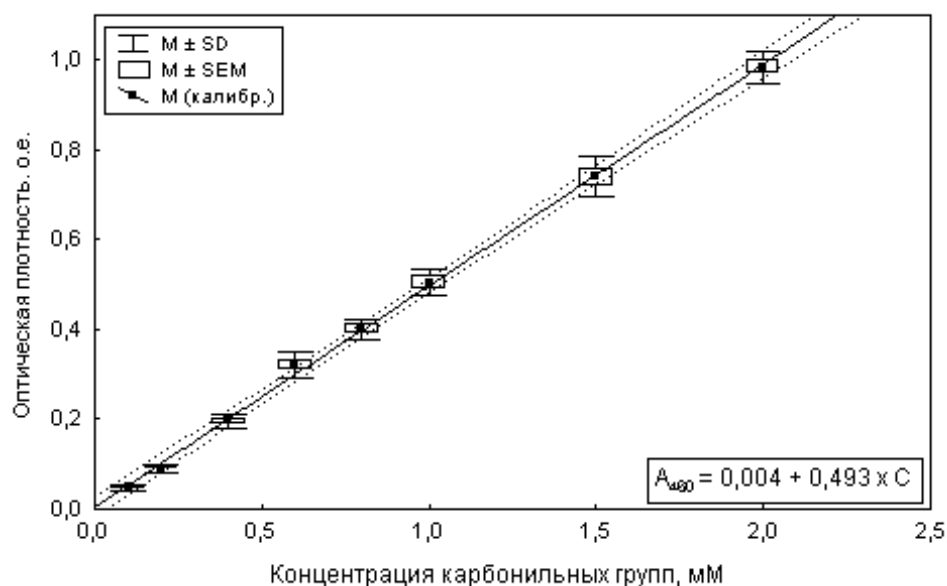


Рисунок 5. Калибровочная кривая для пировиноградной кислоты; длина волны 460 нм. Усреднение данных 5 экспериментов. Точечными линиями ограничены области 99%-ной достоверности линеаризации.

Таким образом, полученные нами результаты демонстрируют возможность применения ДНФГ для определения карбонильных продуктов ПОЛ в МС независимо от конкретного способа инициации ПОЛ.

3.1.3. Сравнительное определение содержания различных продуктов ПОЛ в окисленных липосомах

Для сравнения результатов оценки уровня ПОЛ в МС предложенным нами методом (с использованием ДНФГ) с другими распространенными методами определения продуктов ПОЛ мы провели определение содержания различных продуктов ПОЛ в липосомах, подвергнутых автоокислению и $\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированному ПОЛ (табл. 6), при этом определение ВР-ТБК проводилось только в случае автоокисления из-за неадекватности этого показателя при индукции ПОЛ металлами переменной валентности (см. выше).

Приведенные данные демонстрируют, что динамика накопления в липосомах карбонильных соединений, реагирующих с ДНФГ, в ходе спонтанного и индуцированного окисления качественно сходна с динамикой накопления других продуктов ПОЛ, определяемых с использованием общепринятых методов. В то же время, коли-

чественно накопление карбонильных соединений в период между 3-м и 24-м часами окисления (как при автоокислении, так и при индуцированном ПОЛ) было наиболее выраженным (рис. 6).

Таблица 6

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в липосомах, подвергнутых автоокислению и индуцированному ПОЛ.

Продукты ПОЛ	Автоокисление		Индуцированное ПОЛ**	
	Период окисления, ч			
	3	24	3	24
Карбонильные соединения, реагирующие с ДНФГ, мкМ	141,70 ± 49,31	907,56 ± 200,06*	560,26 ± 110,95	1268,39 ± 153,48*
ВР-ТБК (Метод 1), мкМ:				
без добавления Fe ²⁺	5,360 ± 0,228	23,425 ± 0,871*	***	***
в присутствии Fe ²⁺	14,170 ± 0,199	29,726 ± 0,265*	***	***
ВР-ТБК (Метод 2), мкМ:				
без добавления Fe ²⁺	5,598 ± 0,322	9,145 ± 0,301*	***	***
в присутствии Fe ²⁺	11,453 ± 0,380	20,256 ± 0,426*	***	***
Конъюгированные диены, о.е.	0,009 ± 0,004	0,048 ± 0,008*	0,074 ± 0,031	0,135 ± 0,034*
Кротоновый альдегид, о.е.	0,030 ± 0,009	0,093 ± 0,011*	0,083 ± 0,014	0,177 ± 0,018*
Данные в таблице приведены в виде M ± SD. Усреднение данных 7 экспериментов.				
* Достоверность отличий между показателями после 3 и 24 ч ПОЛ p<0,01.				
** ПОЛ индуцировали добавлением 2,5 мМ ацетата меди (II) и 0,8 мМ H ₂ O ₂ .				
*** Определение показателя неадекватно (см. разд. 3.1.1)				

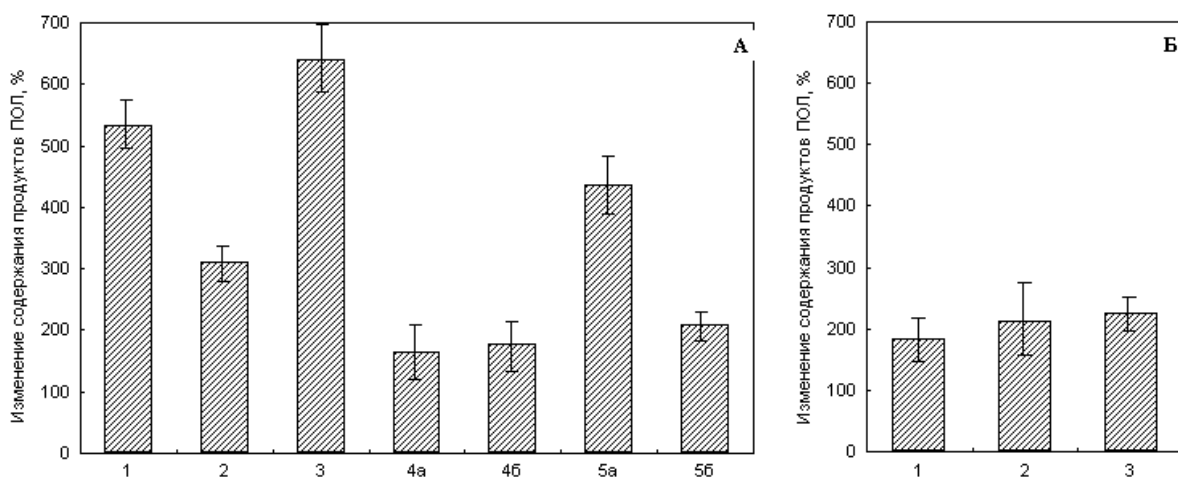


Рисунок 6. Изменение содержания различных продуктов ПОЛ в суспензии липосом (2,38 мг липида/мл) в период с 3 к 24 ч автоокисления (А) и ПОЛ, индуцированного 2,5 мМ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и 0,8 мМ H_2O_2 (Б). За 100 % принято значение соответствующего показателя после 3 ч окисления. Продукты ПОЛ: конъюгированные диены (1); кротоновый альдегид (2); карбонильные соединения, взаимодействующие с ДНФГ (3); ВР-ТБК, определявшиеся по методу 2: в отсутствие Fe^{2+} (4а), в присутствии Fe^{2+} (4б); ВР-ТБК, определявшиеся по методу 1: в отсутствие Fe^{2+} (5а), в присутствии Fe^{2+} (5б). Усреднение результатов 7 экспериментов ($M \pm SD$).

Приведенные данные демонстрируют, что динамика накопления в липосомах карбонильных соединений, реагирующих с ДНФГ, в ходе спонтанного и индуцированного окисления качественно сходна с динамикой накопления других продуктов ПОЛ, определяемых с использованием общепринятых методов. В то же время, количественно накопление карбонильных соединений в период между 3-м и 24-м часами окисления (как при автоокислении, так и при индуцированном ПОЛ) было наиболее выраженным (рис. 6).

Важно отметить, что метод с использованием ДНФГ позволяет наиболее полно определять количество карбонильных соединений, образующихся в ходе ПОЛ, что согласуется с литературными данными [37, 66, 70, 72, 92, 191]. Чувствительность метода с использованием ДНФГ (не хуже 0,02 мМ карбонильных групп) вполне достаточна для скрининговых исследований АО, в то время, как методы спектрофотометрического определения продуктов ПОЛ, предварительно экстрагированных органиче-

скими растворителями (конъюгированные диены и кротоновый альдегид), имеют низкую чувствительность и специфичность и достаточно трудоемки в выполнении (см. разд. 1.3.3).

Этот факт позволяет нам рекомендовать использование определения содержания карбонильных продуктов ПОЛ с ДНФГ для адекватной оценки интенсивности ПОЛ в МС ПОЛ в экспериментах *in vitro*.

3.2. Оптимизация условий применения модельной системы ПОЛ на основе липосом с Cu^{2+} -зависимой индукцией окисления

3.2.1. Зависимость накопления карбонильных соединений в липосомах от длительности периода окисления и особенностей инициации процесса ПОЛ

Из данных, приведенных в разд. 3.1.3, видно, что содержание продуктов ПОЛ в липосомах, подвергнутых окислению в течение 24 ч, существенно выше, чем в липосомах, подвергнутых 3-часовому окислению. Целью последующих экспериментов было изучение динамики накопления карбонильных соединений в ходе ПОЛ липосом в зависимости от длительности периода окисления и вида используемой системы инициации ПОЛ. Эти эксперименты мы проводили в условиях длительного (до 4 сут) окисления липосом. Контрольным препаратом служила суспензия липосом, подвергнутых автоокислению. Для химической индукции ПОЛ добавляли сульфат или ацетат меди (II) (до конечной концентрации 2,5 мМ) по отдельности или в присутствии H_2O_2 , а также только H_2O_2 (конечная концентрация 0,8 мМ).

Таблица 7 представляет полученные нами результаты, а уровни статистической значимости различий между средними величинами различных выборок (экспериментальных групп) указаны в Приложении 1 (Таблицы П.1.1–П.1.13).

Было обнаружено, что в ходе автоокисления в течение первых 6 часов инкубации накопление карбонильных соединений в суспензии липосом незначительно. Существенное возрастание содержания карбониллов происходит к 24-му часу, а после 48-часового окисления концентрация карбонильных соединений в препарате автоокисленных липосом не отличается значимо от их концентрации в липосомах, подвергнутых индуцированному ПОЛ (все изученные варианты). Между 48 и 72 ч ПОЛ содер-

жание карбониллов практически не изменяется, а к 96-му часу даже проявляет тенденцию к снижению, но это снижение статистически незначимо (см. Приложение 1).

Таблица 7

Содержание карбонильных соединений (мМ) в суспензии липосом, подвергнутых спонтанному и индуцированному окислению при 37 °С

Период окисления, ч	Индукция ПОЛ*					
	A	HP	CS	CSHP	CA	CAHP
1	0,113 ± 0,038	0,169 ± 0,047	0,107 ± 0,028	0,169 ± 0,054	0,157 ± 0,056	0,308 ± 0,109
3	0,141 ± 0,049	0,219 ± 0,057	0,175 ± 0,043	0,270 ± 0,103	0,300 ± 0,072	0,560 ± 0,111
6	0,189 ± 0,065	0,357 ± 0,079	0,303 ± 0,113	0,417 ± 0,186	0,560 ± 0,103	0,777 ± 0,106
24	0,908 ± 0,200	0,988 ± 0,177	1,214 ± 0,141	1,270 ± 0,139	1,238 ± 0,148	1,268 ± 0,154
48	1,228 ± 0,296	1,184 ± 0,164	1,387 ± 0,160	1,392 ± 0,158	1,259 ± 0,150	1,298 ± 0,246
72	1,486 ± 0,061	1,437 ± 0,028	1,386 ± 0,044	1,376 ± 0,048	1,201 ± 0,033	1,160 ± 0,101
96	1,296 ± 0,209	1,422 ± 0,072	1,373 ± 0,032	1,373 ± 0,022	1,212 ± 0,039	0,961 ± 0,165

Данные (усреднение по 15–22 экспериментам) приведены в виде $M \pm SD$. Уровни статистической значимости различий между группами приведены в Приложении 1.

* Условные обозначения видов индукции: **A** – автоокисление; **HP** – H_2O_2 ; **CS** – $CuSO_4$; **CSHP** – $CuSO_4 + H_2O_2$; **CA** – $Cu(CH_3COO)_2$; **CAHP** – $Cu(CH_3COO)_2 + H_2O_2$. Конечная концентрация H_2O_2 в инкубационной среде 0,8 мМ, солей Cu^{2+} – 2,5 мМ.

Добавление к инкубационной среде H_2O_2 несколько ускоряет накопление карбонильных соединений в первые часы процесса ПОЛ (статистически значимые отличия,

$p < 0,01$), однако на отсроченных этапах окисления (после 24 ч окисления и позже) содержание карбонильных соединений в суспензиях липосом, подвергнутых автоокислению и H_2O_2 -индуцированному окислению, значимо не отличимо друг от друга ($p > 0,2$) (рис. 7, А).

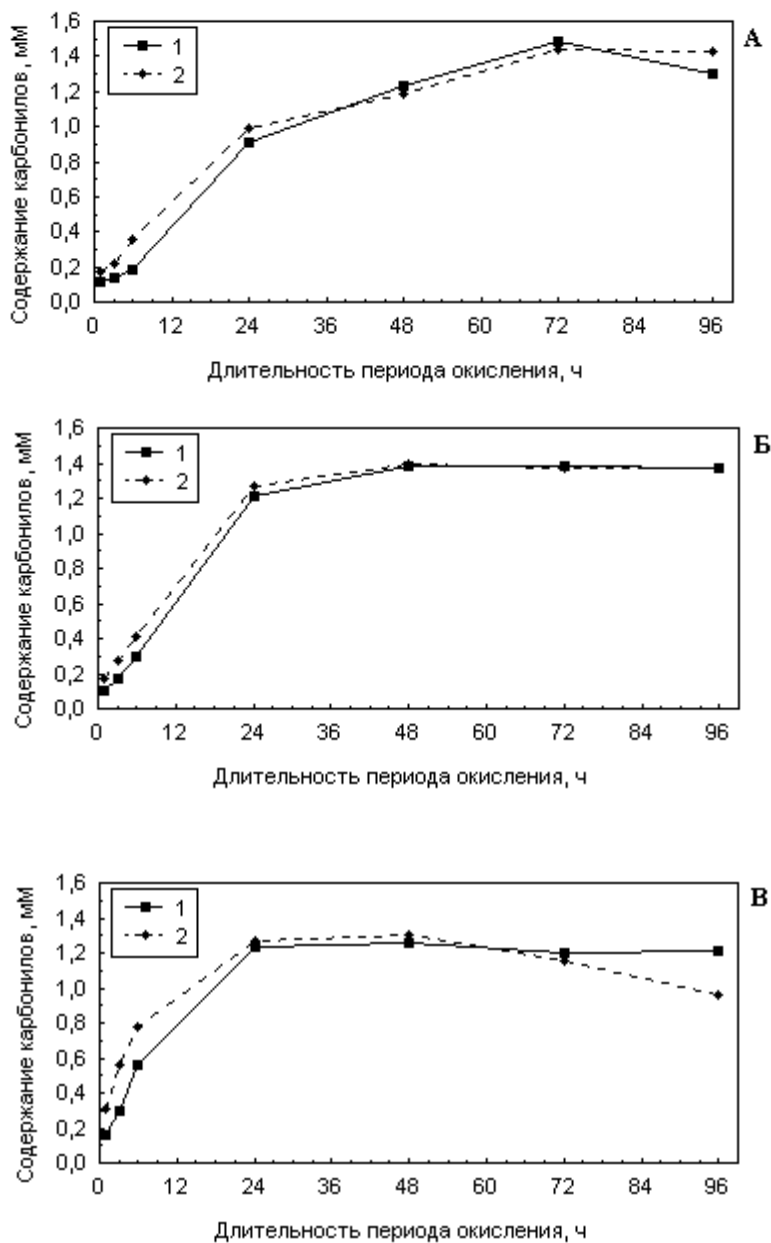


Рисунок 7. Изменение содержания карбониллов в ходе длительного окисления липосом при 37 °С в отсутствие солей меди (А), при добавлении 2,5 мМ сульфата (Б) или ацетата (В) меди (II). 1 – в отсутствие H_2O_2 ; 2 – при добавлении 0,8 мМ H_2O_2 . Показатели оценки ошибки репрезентативности приведены в табл. 7.

Индукция окисления липосом добавлением CuSO_4 приводит к достоверному повышению уровня карбонильных продуктов ПОЛ только при средних сроках окисления (6 и 24 ч) ($p < 0,006$), но не на начальных или отсроченных этапах ПОЛ. Сочетание H_2O_2 с CuSO_4 приводит к некоторому усилению накопления карбониллов на начальных этапах окисления (1 и 3 ч инкубации) в сравнении с индукцией ПОЛ только CuSO_4 , однако указанные различия статистически сомнительны ($0,016 < p < 0,042$). При большей длительности окисления различия в содержании карбониллов в липосомах при индукции ПОЛ CuSO_4 и $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ недостоверны ($p > 0,175$). В то же время, концентрация карбониллов в суспензии липосом, подвергнутых $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированному окислению в течение 1, 3, 6 и 24 часов, достоверно выше, чем в суспензии автоокисленных липосом ($p < 0,003$). Статистически значимые отличия в накоплении карбониллов при индукции окисления в липосомах добавлением H_2O_2 , CuSO_4 или $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ отсутствуют при всех сроках окисления (рис. 7, Б).

Следует отметить, что во всех перечисленных случаях дальнейшее накопление карбониллов в окисленных липосомах прекращалось через 48–72 ч от момента инициации ПОЛ по достижении концентрации карбониллов около 1,4 мМ (табл. 7, рис. 7, А, Б). По-видимому, подобная динамика нарастания содержания карбонильных соединений в липосомах при окислении может свидетельствовать о том, что к этому моменту происходит окисление всего пула доступных субстратов. Возможно двойное объяснение, почему концентрация образовавшихся карбониллов примерно в 2 раза ниже теоретически возможной: (1) с образованием карбонильных продуктов протекает окисление не более чем половины ненасыщенных жирных кислот; (2) окислению подвергаются остатки ПНЖК и лишь незначительная часть остатков олеиновой кислоты, содержащей только одну ненасыщенную связь.

Замена в роли индуктора ПОЛ CuSO_4 на $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ приводит к усилению ПОЛ на начальных этапах окисления липосом (различия сомнительны через 1 ч окисления, $p = 0,034$, и высоко значимы через 3 и 6 ч окисления, $p < 0,0004$). Однако после 24 и 48 ч инкубации содержание карбониллов в липосомах статистически неотличимо при индукции ПОЛ различными солями меди ($p > 0,12$). Более того, уровень карбониллов в липосомах при индукции ацетатом меди стабилизируется при длительном окислении

на более низком уровне (1,2–1,3 мМ) (при 72-часовом и более длительном окислении отличия статистически значимы, $p < 0,001$).

Если для инициации ПОЛ мы использовали систему $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$, то накопление карбониллов в липосомах в первые 6 часов инкубации было наиболее интенсивным по сравнению с перечисленными выше случаями (отличия достоверны, см. Приложение 1). Даже в сравнении с $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ при инициации ПОЛ добавлением $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ содержание карбониллов в липосомах было существенно выше после 1, 3 и 6 ч окисления. При более длительных сроках окисления (24 ч и более) уровень карбониллов стабилизируется на том же уровне, что и при инициации ПОЛ только $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, а к 96-му часу проявляет тенденцию к снижению (отличия сомнительны, $p = 0,0365$, относительно содержания карбониллов после 72 ч окисления).

Таким образом, инициация окисления липосом ацетатом меди (II) вызывает более выраженное накопление карбонильных продуктов ПОЛ, чем инициация окисления CuSO_4 .

Для проверки предположения, что именно природа аниона играет важную роль в различиях прооксидантных эффектов солей Cu^{2+} , мы изучили влияние различных концентраций ацетата натрия на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах, окисление которых было инициировано CuSO_4 или $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$. В предварительных опытах мы обнаружили, что в отсутствие липосом взаимодействие CuSO_4 или $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ с H_2O_2 и ацетатом натрия не приводит к образованию продуктов, формирующих окрашенные производные с ДНФГ (данные не приводятся).

Добавление CH_3COONa (конечная концентрация 0,2–5 мМ) к инкубационной среде приводит к возрастанию содержания карбонильных соединений в липосомах при длительности окисления 1–24 ч, при этом эффект CH_3COONa усиливается с увеличением его концентрации в инкубационной среде (рис. 8).

Увеличение содержания карбонильных соединений в липосомах под действием CH_3COONa относительно контроля (без добавления CH_3COONa) было наиболее существенным после 6-часового периода окисления. С другой стороны, после 24- и 48-часового окисления в присутствии CH_3COONa содержание карбонильных соединений в липосомах значимо не отличалось от такового в контроле.

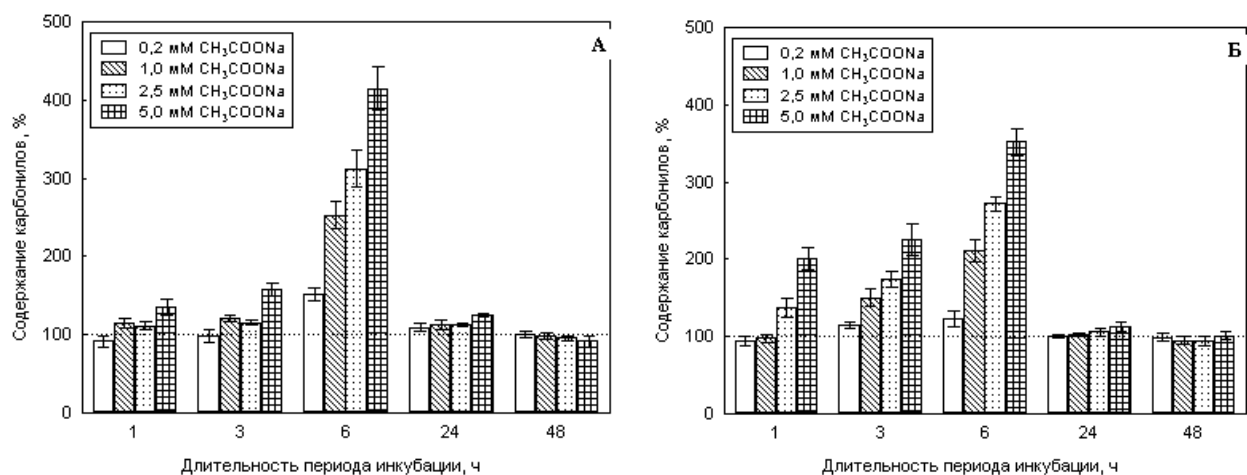


Рисунок 8. Влияние добавления в инкубационную среду ацетата натрия на концентрацию карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах, окисление которых инициировали добавлением 2,5 мМ CuSO₄ в отсутствие (А) или при одновременном добавлении 0,8 мМ H₂O₂ (Б). За 100 % принимали содержание карбонильных соединений в липосомах после соответствующего периода окисления в отсутствие CH₃COONa в инкубационной среде (пунктирная линия). Усреднение данных 4 экспериментов (M ± SD).

Этот факт легко объясним, если учесть, что при инициации ПОЛ в липосомах солями меди (II) к 24–48-му часам инкубации нарастание концентрации карбонильных соединений прекращается (см. рис. 7).

Таким образом, получается, что ацетат натрия усиливает накопление карбонильных продуктов ПОЛ на более ранних сроках окисления, другими словами, при окислении липосом в присутствии CH₃COONa содержание карбонильных продуктов ПОЛ быстрее достигает максимума (рис. 9, Приложение 2).

Можно предположить, что возрастание скорости образования карбонильных соединений на ранних этапах окисления при добавлении в инкубационную среду ацетат-анионов может быть связано со способностью образующегося в реакции Cu²⁺ с H₂O₂ гидроксил-радикала [82] вызывать окислительное декарбоксилирование карбоновых кислот с образованием соответствующих алкильных радикалов. Такие радикалы (в нашем случае — метил-радикал) хотя и обладают меньшей реакционной способностью, чем гидроксил-радикал, однако могут легче проникать в липидную фазу, где выступают в роли одного из радикальных инициаторов реакций ПОЛ.

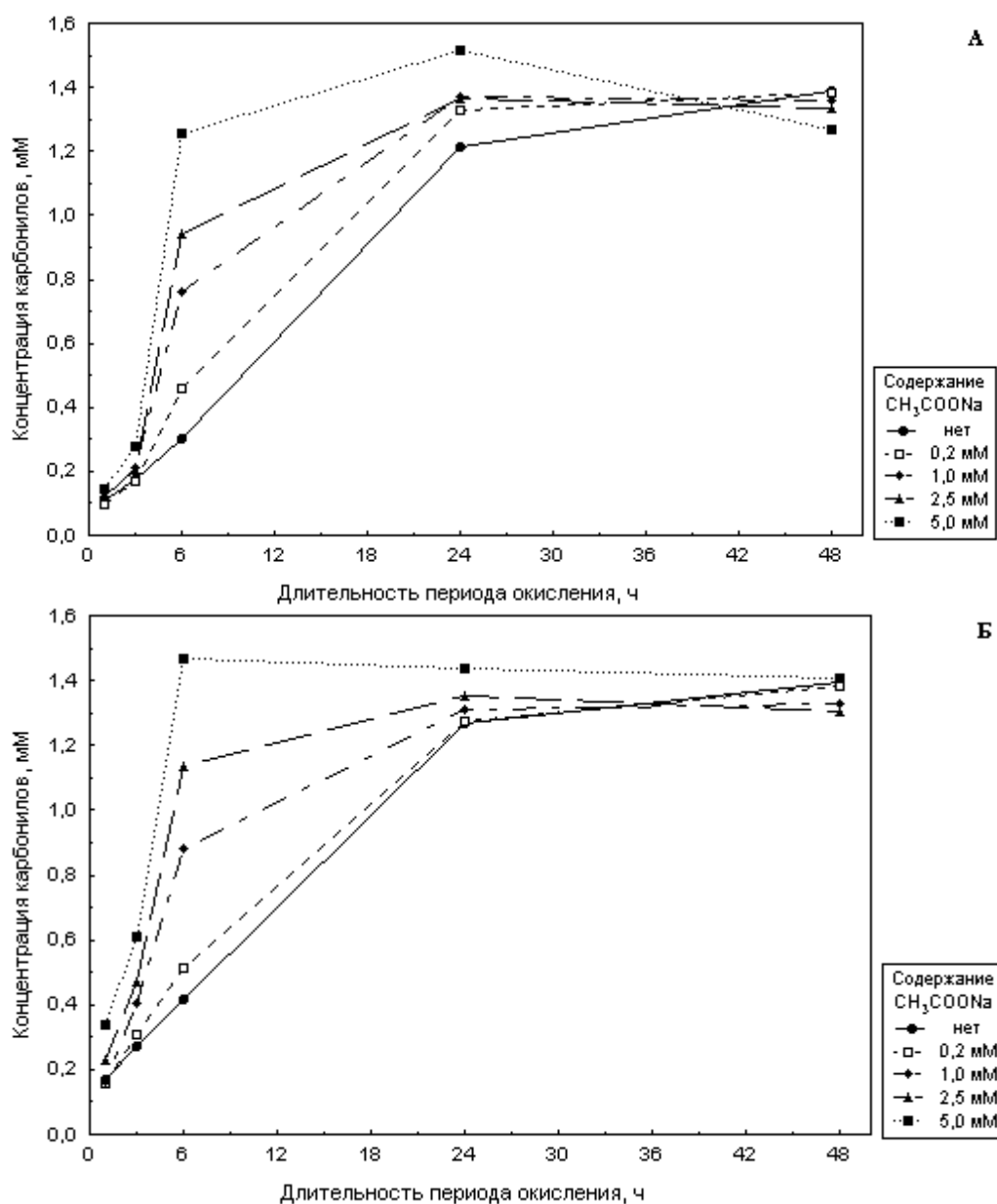


Рисунок 9. Концентрация карбонильных соединений в липосомах, подвергнутому индуцированному ПОЛ в присутствии различных концентраций ацетата натрия. Окисление липосом инициировали добавлением 2,5 мМ CuSO_4 в отсутствие (А) или при одновременном добавлении 0,8 мМ H_2O_2 (Б). Показатели оценки ошибки репрезентативности и уровни статистической значимости различий между группами приведены в Приложении 2.

Суммируя приведенные в этом разделе результаты, можно сказать, что динамика изменения концентрации карбонильных соединений в липосомах в процессе их окисления существенно зависит от того, какое именно вещество (смесь веществ) было использовано для инициации ПОЛ. При этом процесс окисления, в зависимости от ис-

пользованного инициатора, с фиксируемой интенсивностью протекает в течение первых 24–72 часов. В течение первых 24–48 часов окисления скорость накопления карбонильных соединений непостоянна и существенно зависит от способа инициации ПОЛ. Учитывая, что эффективность действия АО существенно зависит от соотношения концентрации АО и скорости зарождению новых цепей окисления (подробнее см. [7]), можно обоснованно полагать, что одно и то же соединение способно на разных временных этапах ПОЛ липосом проявлять отличия в антиоксидантных свойствах.

Следовательно, на основании приведенных результатов экспериментов, мы считаем, что для всестороннего изучения эффектов веществ на интенсивность ПОЛ в липосомальных МС желательно проводить эксперименты в разные сроки от момента инициации ПОЛ при длительности периода окисления субстрата 24–48 часов.

3.2.2. Влияние концентрации фосфатидилхолина на накопление карбонильных соединений в липосомах в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ

Исходя из результатов, приведенных в разд. 3.2.1, интересным представляется выяснить, зависит ли каким-либо образом максимально достижимое в ходе окисления липосом содержание карбонильных продуктов ПОЛ от концентрации фосфолипида в суспензии липосом. Для этого нами была изучена интенсивность накопления карбонильных соединений в липосомах в процессе автоокисления и при ПОЛ, индуцированном ацетатом меди (II) и H_2O_2 , при различных концентрациях фосфолипида в суспензии липосом.

Результаты наших опытов показали, что от концентрации фосфолипида в суспензии липосом существенно зависит как максимально достижимая концентрация карбонильных соединений в липосомах в ходе окисления, так и скорость накопления карбонильных продуктов ПОЛ (рис. 10).

Анализ зависимости концентрации карбонильных продуктов ПОЛ C_C в окисленных липосомах от концентрации липида C_L в суспензии липосом путем расчета коэффициента Пирсона r демонстрирует наличие очень жесткой прямой взаимосвязи между этими показателями при любой длительности периода окисления (коэффициент Пирсона составил от 0,959 до 0,996, $p < 0,041$) (Приложение 3).

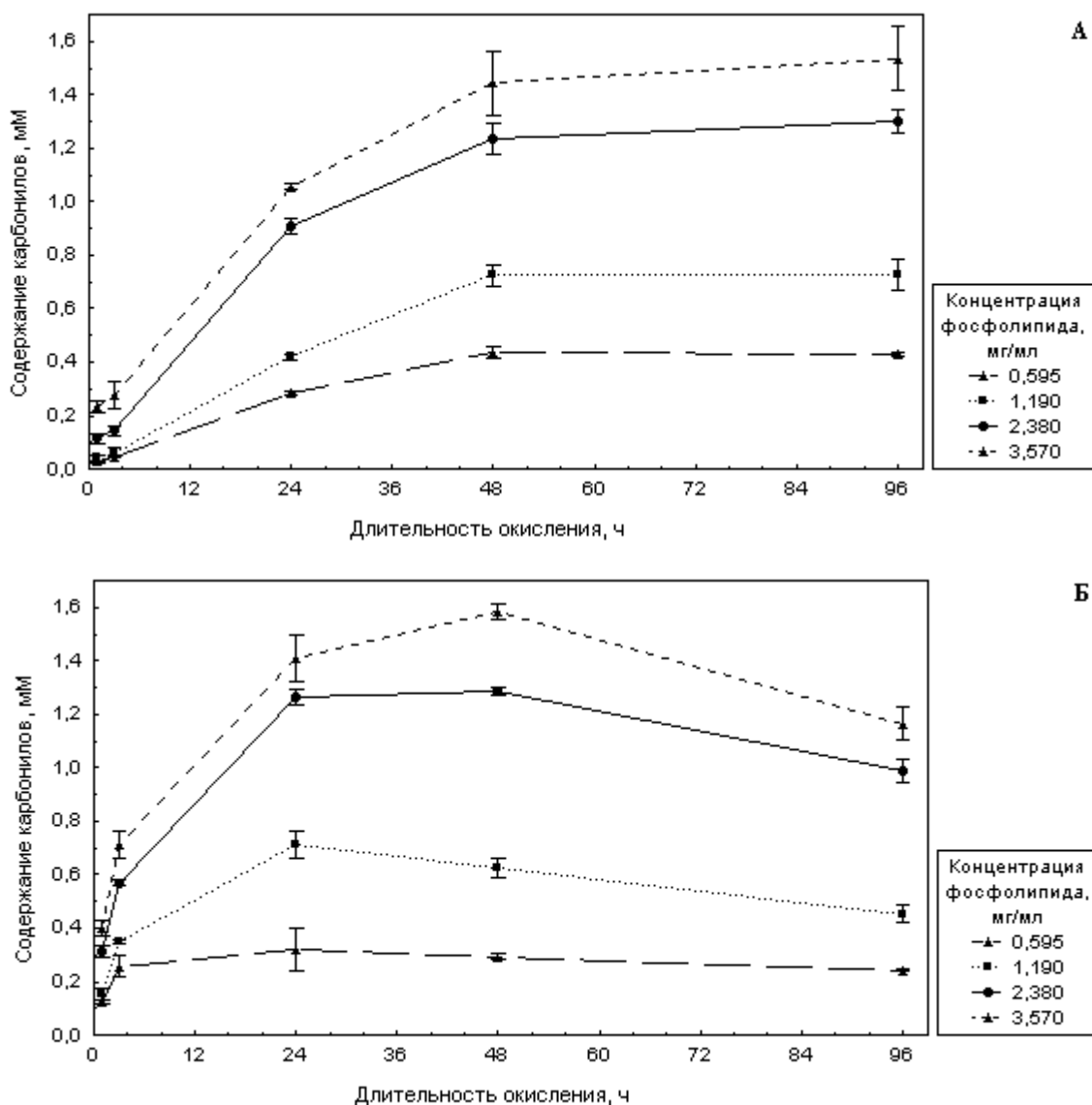


Рисунок 10. Содержание карбонильных соединений в липосомах, подвергнутому автоокислению (А) и окислению, инициированному добавлением 2,5 мМ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и 0,8 мМ H_2O_2 (Б), при различной концентрации фосфатидилхолина в суспензии липосом. Усреднение результатов 3 экспериментов (данные приведены в виде $M \pm SD$).

Тем не менее, построение соответствующих диаграмм распределения со сглаживающими кривыми показало, что линейная функция зависимости C_C от C_L хорошо согласуется с экспериментальными данными только на начальных этапах окисления (продолжительность периода окисления 1 или 3 ч). При более длительном окислении липосом (как при спонтанном, так и при индуцированном) линейная функция уже недостаточно точно отражает зависимости C_C от C_L , и на участке концентраций 2,38–

3,57 мг липида/мл суспензии кривая функции зависимости характеризуется более пологим наклоном (рис. 11).

Определенную дополнительную информацию могло бы принести изучение накопления карбонильных соединений в липосомах с концентрацией липида выше 3,57 мг/мл. Однако проведение таких опытов оказалось затруднительным вследствие существенного светорассеяния реакционной смеси при определении ДНФГ-реактивных карбониллов, по-видимому, из-за высокого содержания плохо растворимых динитрофенилгидразонов. Изменение же соотношения объемов образца и реактивов приводило к заметному искажению результатов анализа и изменению уровня ошибки анализа (данные не приводятся).

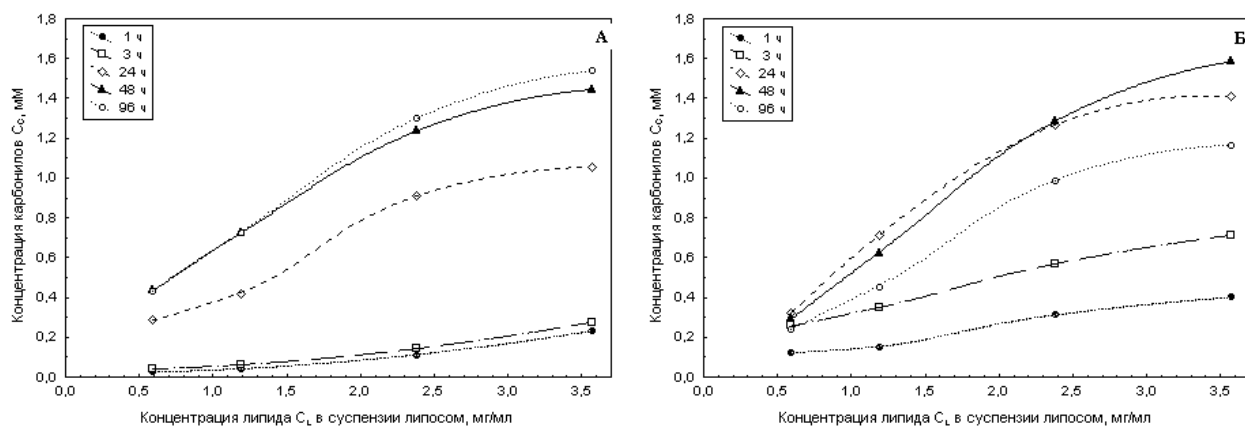


Рисунок 11. Диаграммы распределения со сглаживающими кривыми для концентрации карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах в зависимости от концентрации липида при различной длительности периода спонтанного (А) или $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного (Б) окисления. Длительность периода окисления указана в легендах диаграмм после идентификаторов соответствующих линий.

Скорость накопления карбонильных соединений (графически выражена углом наклона отрезков ломаной на рис. 10) также существенно зависела от концентрации липида в суспензии липосом и при длительности периода окисления до 24 ч была тем выше, чем больше была концентрация липида.

Полученные нами результаты позволили выявить зависимость концентрации образующихся при окислении липосом карбонильных соединений от концентрации липида в суспензии липосом. Учитывая изложенные выше особенности этой зависимо-

сти при исследовании особенностей влияния химических соединений на уровень ПОЛ в липосомальных МС рекомендуется использовать препараты фосфатидилхолиновых липосом с концентрацией липида 2,38 мг/мл суспензии.

3.2.3. Возможность использования буферных растворов в модельной системе на основе липосом при Cu^{2+} -зависимой индукции ПОЛ

При спонтанном и Cu^{2+} -индуцированном окислении суспензии фосфатидилхолиновых липосом происходит постепенное закисление инкубационной смеси (рис. 12). Степень закисления при Cu^{2+} -индуцированном ПОЛ меняется относительно медленно, а при автоокислении закисление среды происходит медленно в первые сутки инкубации, затем — существенно ускоряется. Этот факт привел нас к необходимости решить вопрос о возможности применения каких-либо буферных растворов в ходе использования предложенной МС ПОЛ.

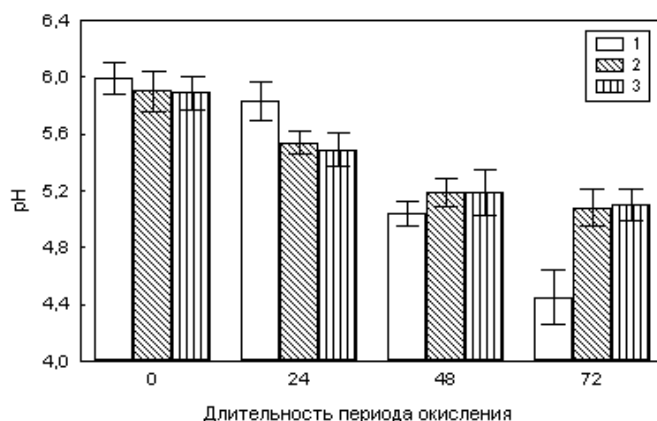


Рисунок 12. Изменение рН инкубационной среды в ходе длительного окисления фосфатидилхолиновых липосом (2,38 мг/мл): спонтанного (1), индуцированного $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (2) и индуцированного $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (3).

Вообще говоря, выбор буферобразующих веществ для применения при Cu^{2+} -зависимой индукции ПОЛ существенно ограничен. Применение фосфатных буферных растворов невозможно из-за образования плохо растворимых фосфатов меди. Такие широко применяемые в биохимических исследованиях буферобразующие вещества, как трис, трицин, глицилглицин, BES и TES образуют прочные комплексы с Cu

[13]. НЕРЕС, не образующий прочных комплексов с ионами меди, тем не менее обладает способностью стимулировать интенсивность Cu^{2+} -зависимого ПОЛ [92].

Известно, что часто используемый в биологических исследованиях как основа БР MES (2-морфолиноэтансульфоновая кислота) лишь незначительно связывается с ионами меди [13]. В литературе мы не нашли сведений относительно его влияния на интенсивность ПОЛ.

Мы изучили возможность влияния буферных растворов на основе MES на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах при автоокислении и Cu^{2+} -индуцированном ПОЛ. Поскольку MES применяется для приготовления буферных растворов в концентрациях 20–100 мМ, нами для экспериментов была взята его минимальная применяемая концентрация — 20 мМ. В результате эксперимента нами было обнаружено, что MES способен существенно (на 21 – 87 %) усиливать накопление карбонильных соединений в ходе как Cu^{2+} -индуцированного, так и спонтанного окисления липосом (рис. 13, Приложение 4). Лишь при индукции ПОЛ ацетатом меди в присутствии H_2O_2 мы не наблюдали прооксидантного действия MES ни при одном сроке инкубации липосом.

Также нами было исследовано влияние на интенсивность ПОЛ в липосомальной модельной системе солей органических кислот, часто используемых в качестве основы для приготовления буферных растворов [13]: уксусной, янтарной и лимонной. Приготовленные на основе соответствующих солей буферные растворы (концентрация анионов карбоновых кислот составляла 2 мМ или 10 мМ, рН 6,0) использовали для получения суспензии липосом вместо дистиллированной воды.

Наши эксперименты показали, что ацетатный буферный раствор выраженно стимулирует накопление карбонильных соединений в ходе $\text{CuSO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного ПОЛ липосом (рис. 14, А, Б, Приложение 5). Наибольший прооксидантный эффект наблюдается при длительности окисления 6 ч. При индукции ПОЛ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2+\text{H}_2\text{O}_2$ прооксидантный эффект ацетатного БР заметен лишь при концентрации 10 мМ (рис. 14, Д). Незначительность прооксидантного действия ацетата в этом случае, возможно, объясняется наличием в инкубационной среде значительного количества (5 мМ) анионов ацетата, происходящих из молекул инициатора (ацетат меди).

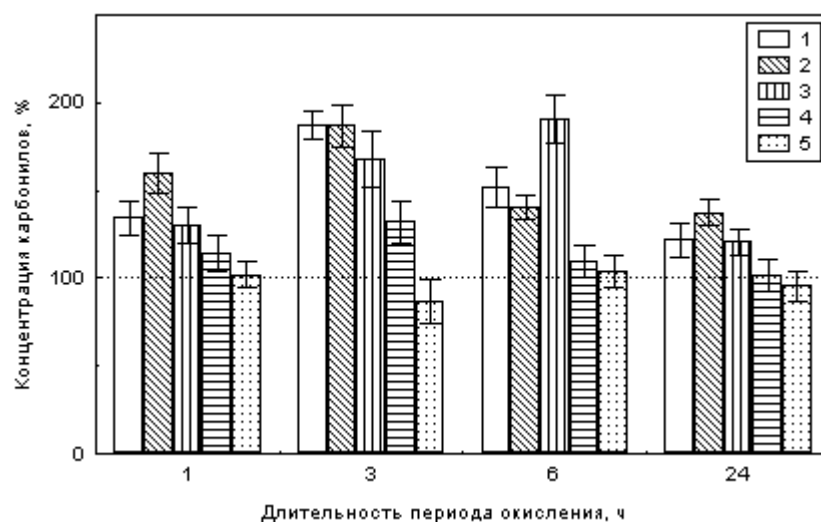


Рисунок 13. Влияние 20 мМ MES–NaOH буферного раствора (pH 6,8) на содержание карбонильных соединений в липосомах в ходе автоокисления (1) и окисления, индуцированного: 2,5 мМ CuSO_4 (2), 2,5 мМ CuSO_4 + 0,8 мМ H_2O_2 (3), 2,5 мМ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (4), 2,5 мМ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + 0,8 мМ H_2O_2 (5). За 100 % принимали значение показателя на соответствующий момент времени в контрольном незабуференном препарате липосом. Усреднение данных 4 экспериментов ($M \pm SD$). Абсолютные значения содержания карбонильных соединений и уровни статистической значимости различий между группами приведены в Приложении 4.

У сукцинатного буферного раствора при индукции ПОЛ $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ нами было обнаружено некоторое прооксидантное действие на отдельных временных этапах окисления липосом. Однако влияние сукцинатного буферного раствора было существенно ниже, чем у ацетатного буферного раствора (рис. 14, А, Б). С другой стороны, в случае $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного окисления липосом сукцинатный буферный раствор существенно снижал содержание карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах в сравнении с контролем через 3 и 6 ч окисления (рис. 14, В, Г). Однако после 24-часового окисления содержание карбонильных соединений в липосомах, инкубированных в присутствии сукцинатного буферного раствора не было отличным от такового в контроле.

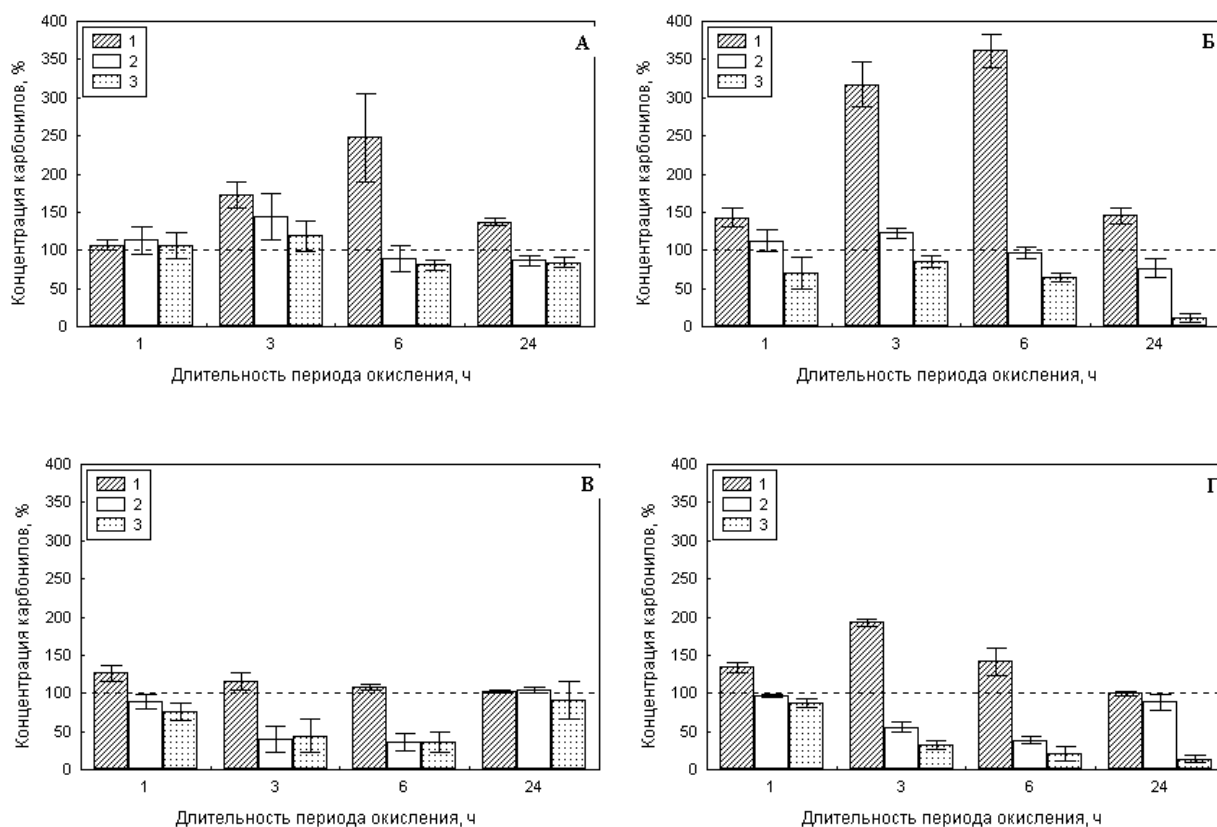


Рисунок 14. Влияние буферных растворов (рН 6,0) на основе карбоновых кислот на содержание карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах, окисление которых инициировали добавлением 2,5 мМ CuSO_4 (А, Б) или $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (В, Г) в присутствии 0,8 мМ H_2O_2 : 1 – ацетатный буфер, 2 – сукцинатный буфер, 3 – цитратный буфер. Концентрация буферообразующих веществ 2 мМ (А, В) и 10 мМ (Б, Г). За 100 % принимали содержание карбонильных соединений в липосомах после соответствующего периода окисления в отсутствие карбоновых кислот (пунктирная линия). Усреднение данных 4 экспериментов ($M \pm SD$).

Наиболее интересным оказалось влияние на интенсивность ПОЛ в липосомах цитратного буферного раствора. 2 мМ буферный раствор в случае $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного окисления на начальных этапах (1 и 3 ч окисления) наблюдалось незначительное усиление образования карбонильных соединений (рис. 14, А), однако эти отличия от контроля не были статистически значимы. 10 мМ цитратный буферный раствор в этих условиях проявлял статистически значимый ингибирующий эффект на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в течение всего изученного пе-

риода. Более того, к 24-му часу окисления эффект цитрата не только не пропадал, но, наоборот, усиливался (рис. 14, Б).

При $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированном окислении цитратные буферные растворы обеих исследованных концентраций достоверно снижал содержание карбонильных соединений в липосомах при длительности окисления 1–6 ч. Однако в дальнейшем (к 24-му часу окисления) антиоксидантный эффект 2 мМ цитратного буферного раствора полностью исчезал (рис. 14, В). Напротив, 10 мМ цитратный буферный раствор после 24-часового окисления проявлял наибольший антиоксидантный эффект (рис. 14, Г).

Приведенные данные показывают, что буферные растворы на основе органических соединений (MES, карбоновые кислоты) способны оказывать существенное влияние на процесс накопления в липосомах карбонильных продуктов ПОЛ как при спонтанном, так и при индуцированном окислении.

Таким образом, вопрос о возможности применения каких-либо химических соединений в качестве основы для буферного раствора, не влияющего на интенсивность ПОЛ в МС, остается открытым.

Применительно же к задаче нашего исследования (разработка МС ПОЛ для скрининга АО) обратим внимание на два обстоятельства: (1) при Cu^{2+} -зависимой индукции ПОЛ основное количество карбонильных продуктов в ходе окисления фосфатидилхолиновых липосом образуется в течение первых 24 ч окисления; (2) снижение pH инкубационной среды в течение первых суток окисления незначительно, а при Cu^{2+} -зависимой индукции ПОЛ достаточно мало и в последующие сутки. С учетом этих предпосылок мы полагаем, что для целей скрининговой оценки антиоксидантных свойств химических соединений допустимо применение МС ПОЛ длительного (до 24 ч) окисления на основе незабуференной суспензии липосом.

Основываясь на приведенных в настоящей главе данных наших экспериментальных исследований, можно сделать следующие выводы:

- В МС ПОЛ в условиях индукции окисления солями металлов переменной валентности адекватные результаты для оценки уровня ПОЛ дает применение для опре-

деления содержания карбонильных продуктов ПОЛ динитрофенилгидразина, но не тиобарбитуровой кислоты.

- Динамика изменения концентрации карбонильных продуктов ПОЛ в процессе окисления фосфатидилхолиновых липосом существенно зависит от способа инициации процесса ПОЛ и от концентрации фосфолипида в суспензии липосом. Наиболее существенные различия в скорости накопления карбонильных продуктов ПОЛ наблюдаются в течение первых 24 ч окисления липосом.
- Компоненты широко используемых в биологических исследованиях буферных растворов способны существенно влиять (стимулировать или подавлять) на накопление в липосомах карбонильных продуктов ПОЛ в ходе окисления.

Таким образом, результаты наших экспериментов, изложенные в главе 3, позволяют нам обоснованно рекомендовать применять МС ПОЛ на основе незабуференной суспензии липосом (2,38 мг липида/мл суспензии) и метода определения карбонильных соединений с использованием ДНФГ для оценки антиоксидантных свойств химических соединений в скрининговых исследованиях, а также иных работах, требующих проведения большого числа серийных экспериментов.

При этом для адекватного заключения об особенностях антиоксидантного действия конкретного вещества, а также для выявления возможностей и условий проявления АО прооксидантного действия, целесообразно оценивать влияние вещества на интенсивность ПОЛ на различных временных этапах процесса окисления при длительности проведения эксперимента 24 – 48 часов.

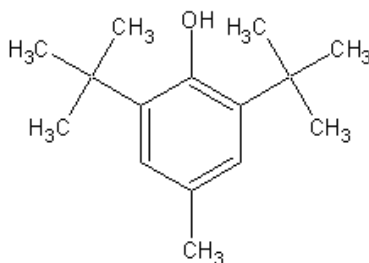
Глава 4. Оценка особенностей антиоксидантного действия лекарственных препаратов с использованием модельной системы ПОЛ на основе фосфатидилхолиновых липосом

Разработанную нами МС ПОЛ (см. главу 3) мы использовали для изучения особенностей влияния на интенсивность ПОЛ на различных временных этапах окисления липосом некоторых химических соединений, которые применяются в медицине среди прочего в качестве антиоксидантных препаратов.

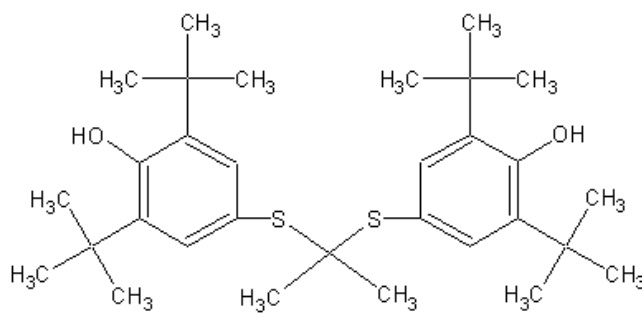
4.1. Влияние липофильных антиоксидантов на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомальной модельной системе

4.1.1. Особенности влияния липофильных фенольных антиоксидантов на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах

Механизмы и особенности действия АО на различные звенья ПОЛ наиболее интенсивно изучаются на примере липофильных АО фенольного типа. Классическим представителем этой группы АО является ионол (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол), несущий пространственно объемные заместители:



Мы изучили влияние на ПОЛ липосом ионола и структурно сходного с ним пробукола или 4,4'-(изопропилидендитио)-бис-(2,6-ди-*трет*-бутилфенол)а



применяющегося в медицине в качестве гипохолестеринемического средства при сердечно-сосудистых заболеваниях и в качестве АО.

Были изучены особенности действия ионола и пробукола в двух концентрациях: 1,75 ммоль и 35 ммоль АО на моль фосфолипида (в выбранных нами условиях это соответствует конечным концентрациям 4,76 мкМ и 95,2 мкМ в суспензии липосом).

Результаты наших экспериментов показали, что на различных сроках инкубации (т.е. на различных временных этапах ПОЛ) эффективность изученных фенольных АО существенно отличается. При этом особенности эффектов пробукола и ионола при различной длительности периода окисления выражено зависят от концентрации АО в липосомах и от способа инициации ПОЛ (то есть, в сущности, от скорости образования цепей окисления липидов в мембране).

Так, в случае автоокисления липосом и ионол, и пробукол эффективно подавляли накопление карбонильных соединений в липосомах на отсроченных этапах ПОЛ (24 и 48 ч от индукции окисления), при этом эффективность каждого АО в концентрациях 1,75 ммоль/моль липида (рис. 15, **A**) и 35 ммоль/моль липида (рис. 16, **A**) практически не отличалась. Оба АО были примерно равноэффективны. В то же время на ранних этапах автоокисления (до 6 ч) антиоксидантное действие ионола и пробукола было существенно ниже.

Следует иметь в виду, что интенсивность протекания реакций ПОЛ в начальный период автоокисления в нашей МС достаточно низка, но существенно возрастает к 24-му часу инкубации (см. главу 3). Если учесть этот факт, то наши результаты хорошо согласуются с приведенным в работе [6] данными о зависимости антиоксидантной активности природных фенольных АО токоферолов от скорости зарождения свободных радикалов.

В случае Cu^{2+} -индуцированного окисления липосом эффективность антиоксидантного действия изученных веществ гораздо сильнее зависит от концентрации АО, чем при автоокислении. Если ионол и пробукол вносились в МС в концентрации 35 ммоль/моль липида (95,2 мкМ), эффективность антиоксидантного действия этих веществ повышалась с увеличением длительности периода окисления и была наибольшей на отдаленных этапах ПОЛ (48 ч) (рис. 16, **Б, В**). Эффективность антиоксидантного действия ионола и пробукола значимо не отличалась, либо эти отличия были сомнительны ($p > 0,04$).

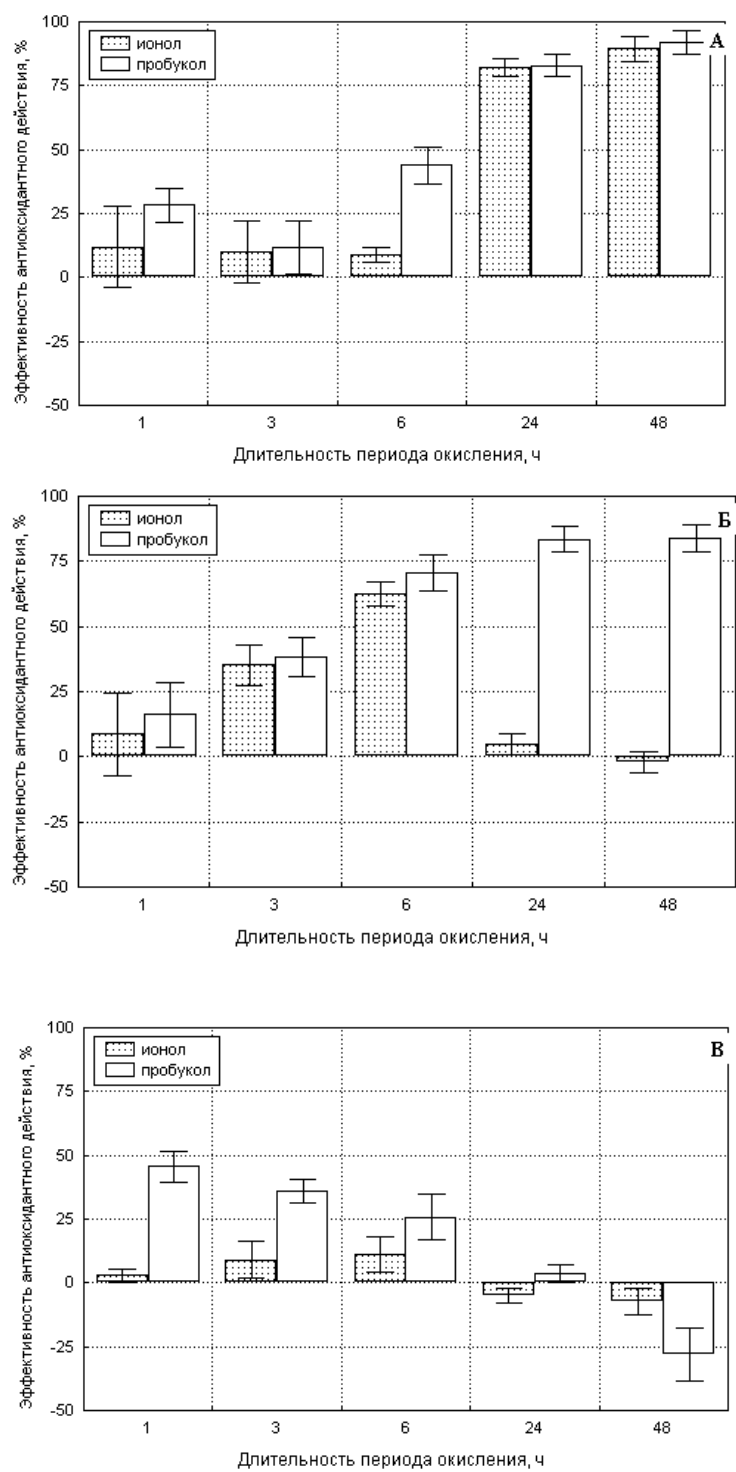


Рисунок 15. Эффективность антиоксидантного действия ионола и пробукола (1,75 ммоль/моль липида или 4,76 мкМ) в липосомах, подвергнутых автоокислению (А) и ПОЛ, индуцированному $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Б) или $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (В). Усреднение данных 5 экспериментов ($M \pm SD$).

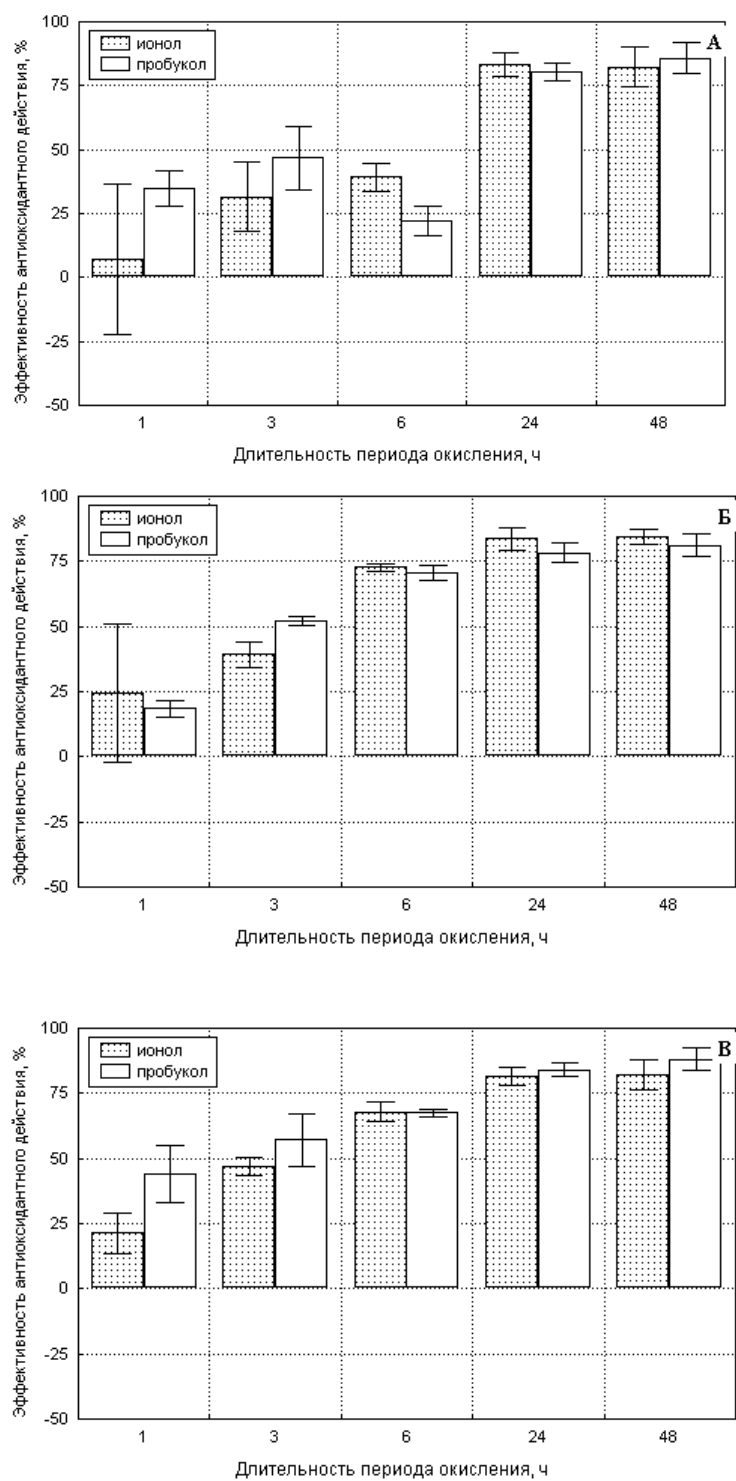


Рисунок 16. Эффективность антиоксидантного действия ионола и пробукола (35 ммоль/моль липида или 95,2 мкМ) в липосомах, подвергнутых автоокислению (А) и ПОЛ, индуцированному $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Б) или $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (В). Усреднение данных 7 экспериментов ($M \pm SD$).

Отметим также, что ионол в концентрации 35 ммоль/моль липида (95,2 мкМ) был практически равноэффективен при обоих способах химической инициации ПОЛ ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ или $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$). Пробукол, напротив, на ранних этапах окисления (1 и 3 ч инкубации) проявлял несколько более выраженное антиоксидантное действие при инициации окисления $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$.

Наибольшая эффективность высоких концентраций синтетических АО фенольного типа (ионол, пробукол) на отсроченных стадиях ПОЛ можно попытаться объяснить следующим образом. Как известно, процесс ПОЛ включает в себя этапы инициации и разветвления цепей (пропагации) [147]. При использовании для иницирования ПОЛ в липосомах реакции Фентона [82] инициация проходит на границе раздела водной и липидной фаз, а этап разветвления цепей полностью протекает в липидной фазе модельной системы [92]. Соответственно этому, на ранних стадиях индуцированного окисления липосом наибольший вклад в усиление интенсивности ПОЛ и накопления карбонильных соединений вносят реакции первичной инициации окисления липидов (см. главу 1), а на отсроченных этапах в первую очередь происходит самоусиление процесса ПОЛ за счет цепных реакций окисления. Поскольку липофильные фенольные АО эффективно перехватывают карбо- и перокси-радикалы, обрывая цепные свободнорадикальные реакции в липидной фазе, но практически не способны взаимодействовать с супероксид-анион-радикалами и гидроксил-радикалами, инициирующими реакции ПОЛ [6, 51], антиоксидантное действие таких соединений будет наиболее выраженным на этапе пропагации реакций ПОЛ.

Совершенно иную картину мы наблюдали, когда ионол и пробукол вносили в МС ПОЛ в концентрации 1,75 ммоль/моль липида (4,76 мкМ). Хотя при инициации окисления липосом $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ пробукол демонстрировал динамику изменения эффективности антиоксидантного действия, схожую с таковой для концентрации 35 ммоль/моль липида (95,2 мкМ), эффективность действия ионола усиливалась только в течение первых 6 ч окисления, а на отсроченных этапах ПОЛ (24 и 48 ч) антиоксидантный эффект ионола полностью исчезал (рис. 15, Б).

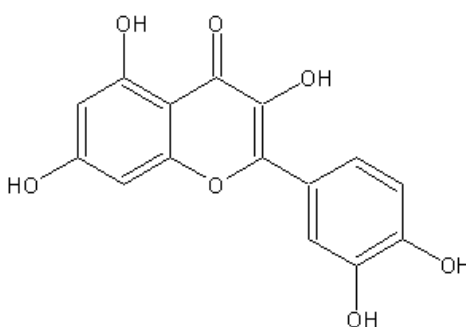
При индукции ПОЛ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$, то есть в случае еще более высокой начальной интенсивности накопления карбонильных продуктов ПОЛ, ионол не проявлял значимого антиоксидантного эффекта при любой длительности окисления, а эф-

эффективность антиоксидантного действия пробукола постепенно снижалась с увеличением длительности периода окисления. На наиболее поздних этапах ПОЛ (48 ч) нами было обнаружено, что оба АО усиливали накопление карбонильных продуктов ПОЛ (рис. 15, В).

Наблюдаемый эффект можно попытаться объяснить с позиций соотношения концентрации АО и присутствующих в липидном бислое радикалов. В ситуации, когда эффективная концентрация АО сравнительно мала относительно концентрации зарождающихся свободных радикалов (исходно низкая концентрация АО в МС или низкая остаточная концентрация АО на отдаленных этапах ПОЛ при высокой скорости зарождения радикалов), большая часть молекул АО быстро превращается в феноксильные радикалы, которые способны с относительно высокой скоростью включаться в продолжение цепей реакций ПОЛ [6]. Естественно, что в этом случае АО будет выступать не как ингибитор, а как субстрат реакций СРО.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что синтетические липофильные фенольные АО в определенных условиях могут на отдаленных (отсроченных) этапах ПОЛ претерпевать трансформацию (инверсию) антиоксидантных свойств в прооксидантные.

В следующей серии мы изучили влияние на накопление карбонильных продуктов ПОЛ липофильного фенольного АО, не имеющего пространственно объемных заместителей,— флавоноида кверцетина (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона):



При автоокислении липосом, то есть в случае достаточно низкой интенсивности зарождения свободных радикалов, кверцетин значительно снижал содержание в липосомах карбонильных продуктов ПОЛ (рис. 17, А). Наибольшую эффективность действия кверцетин демонстрировал на наиболее поздних этапах окисления (24 и 48 ч), аналогично тому, что мы наблюдали в случае ионола и пробукола. Также, как это

имело место для ионола и пробукола, эффективность обеих изученных концентраций кверцетина (1,75 и 35 ммоль/моль липида) при автоокислении значимо не отличалась ($p > 0,035$).

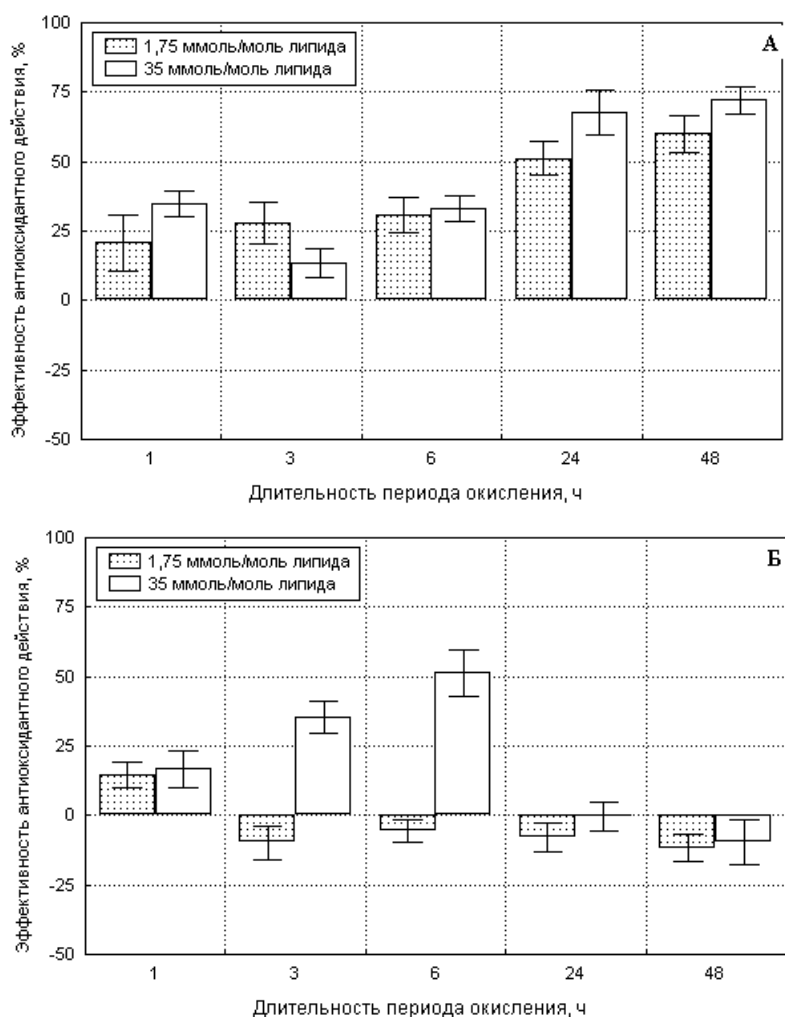


Рисунок 17. Эффективность антиоксидантного действия кверцетина (1,75 и 35 ммоль/моль липида) в липосомах, подвергнутых автоокислению (А) и ПОЛ, индуцированному $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Б). Усреднение данных 4 экспериментов ($M \pm SD$).

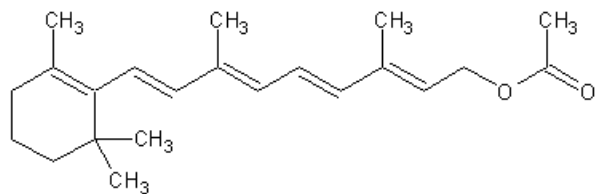
При индукции ПОЛ в липосомах с помощью системы $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ введение в липосомы кверцетина в концентрации 1,75 ммоль/моль липида (4,76 мкМ) было неэффективным в ингибировании ПОЛ. Более того, мы наблюдали слабое, но статистически значимое ($p < 0,01$) прооксидантное действие кверцетина (рис. 17, Б).

В концентрации 35 ммоль/моль липида (95,2 мкМ) кверцетин подавлял накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах в течение первых 6 ч окисления, причем его ингибирующая активность повышалась с удлинением времени инкубации. Однако на отсроченных этапах ПОЛ антиоксидантный эффект кверцетина исчезал (24 ч окисления) (рис. 17, Б). Сходную динамику изменения антиоксидантной активности мы описали выше для некоторых случаев действия ионола (рис. 15, Б).

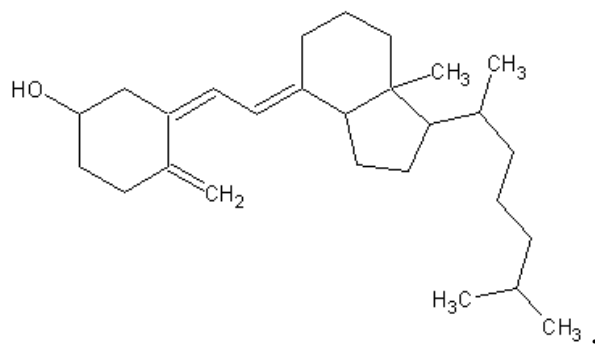
Следовательно, полученные нами данные свидетельствуют в пользу предположения о наличии сходных особенностей антиоксидантного действия и существовании сходных условий инверсии антиоксидантных свойств в прооксидантные у липофильных АО фенольного типа. По всей видимости, особенности влияния конкретных АО на интенсивность ПОЛ в заметной степени определяется концентрацией АО и скоростью зарождения свободных радикалов в липидном бислое, однако проверка этого предположения требует проведения дальнейших углубленных исследований.

4.1.2. Особенности влияния липофильных соединений, содержащих несколько двойных связей, на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах

Нами были изучены особенности влияния на интенсивность ПОЛ соединений, содержащих несколько двойных связей C=C,— ретинола ацетата:



для которого в ряде МС было показано наличие антиоксидантных свойств [139], и эргокальциферола:



способного достаточно легко окисляться под действием кислорода. Оба этих вещества широко применяются в медицине в качестве витаминных препаратов.

Нами было обнаружено, что особенности влияния этих соединений, введенных в липосомы в концентрации 1,75 ммоль/моль липида (4,76 мкМ), на накопление карбонильных продуктов ПОЛ при различной длительности периода окисления липосом существенно отличаются от таковых фенольных АО.

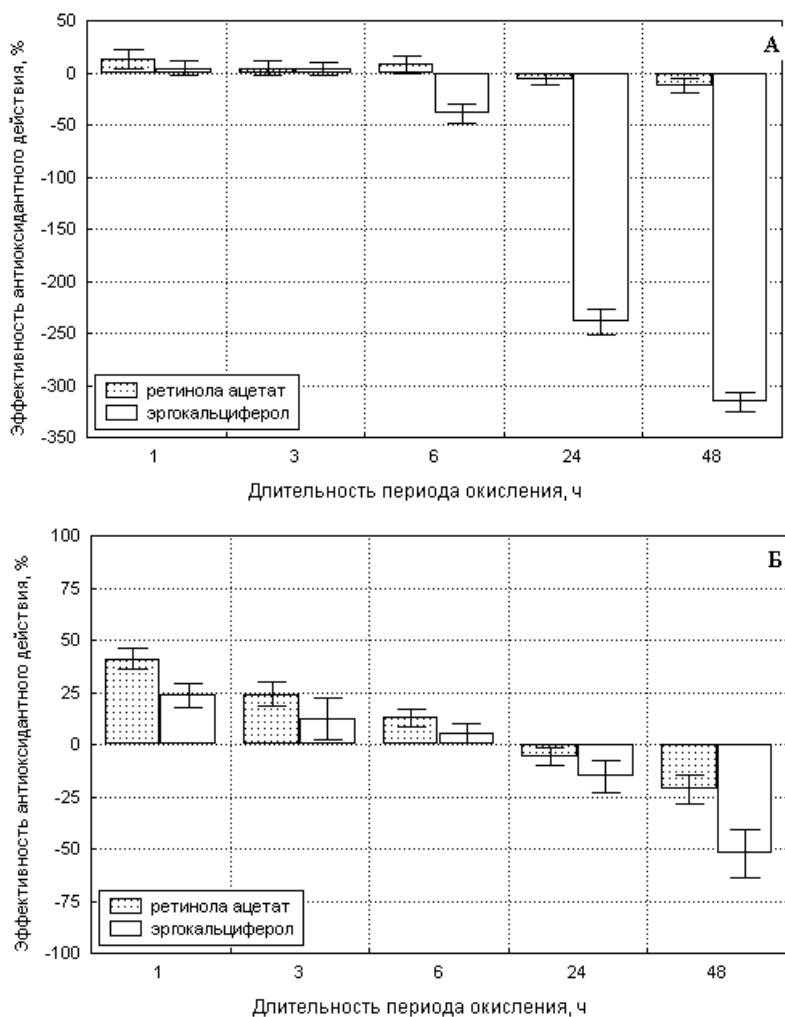


Рисунок 18. Эффективность антиоксидантного действия ретинола ацетата и эргокальциферола (1,75 ммоль/моль липида или 4,76 мкМ) в липосомах, подвергнутых автоокислению (А) и ПОЛ, индуцированному $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Б). Усреднение данных 4 экспериментов ($M \pm SD$).

В отличие от фенольных АО (см. разд. 4.1.1), ретинола ацетат не оказывал достоверного влияния на образование карбонильных продуктов ПОЛ при автоокислении

липосом, проявляя, однако, тенденцию к незначительной стимуляции ПОЛ. Эргокальциферол, не изменяя уровень ПОЛ в течение первых 3 часов автоокисления липосом, на более поздних временных этапах окисления демонстрировал значительную прооксидантную активность. Выраженность стимулирующего эффекта эргокальциферола на уровень ПОЛ усиливается с течением времени (рис. 18, А).

В случае $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного ПОЛ ретинола ацетат и эргокальциферол достоверно снижали содержание карбонильных соединений в липосомах в течение первых 6 часов окисления, но при большей длительности процесса ПОЛ оба соединения проявляли прооксидантное действие, более выраженное у эргокальциферола. Интересным представляется тот факт, что прооксидантная активность эргокальциферола при индуцированном ПОЛ липосом была существенно ниже, чем при автоокислении (рис. 18, Б).

Более высокая антиоксидантная активность ретинола ацетата на начальном этапе ПОЛ согласуется с известными данными о механизме антиоксидантного действия ретинола. Имея в своем составе реакционноспособные двойные связи, ретинол перехватывает свободные радикалы – инициаторы ПОЛ, конкурируя за них с молекулами липидов и тем самым защищая последние от интенсивного окисления. Однако такая ситуация сохраняется лишь до тех пор, пока содержание АО описанного типа достаточно для перехвата основного количества образующихся в ходе СРО радикалов [154]. После истощения пула АО с ненасыщенными связями скорость СРО существенно возрастает. Кроме того, при определенных условиях продукты окисления самих АО этой группы могут вовлекаться в дальнейшее развитие реакций СРО, что определяет наличие у АО с ненасыщенными связями прооксидантных свойств [139]. По-видимому, аналогичным образом можно объяснить также и зависимость эффектов эргокальциферола на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах от длительности периода окисления.

4.2. Влияние гидрофильных антиоксидантов на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомальной модельной системе

4.2.1. Особенности влияния тиолов на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах

Природные низкомолекулярные тиолы (глутатион, цистеин, эрготионеин) играют важную роль в защите организма от окислительных повреждений. Тиоловые соединения могут являться активным веществом различных лекарственных препаратов (ацетилцистеин, каптоприл, унитиол). Поэтому определенный интерес представляет изучение влияния тиолов на интенсивность ПОЛ в предложенной нами МС при различных сроках окисления.

Мы изучили эффекты двух тиоловых соединений — природного трипептида глутатиона (в восстановленной форме), содержащего одну тиоловую группу, и лекарственного препарата унитиола (2,3-димеркаптопропансульфоната натрия), содержащего две тиоловые группы, — на накопление карбонильных соединений в ходе спонтанного и индуцированного $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ПОЛ липосом.

Было обнаружено, что глутатион и унитиол в концентрации 100 мкМ проявляют заметное антиоксидантное действие только на начальном этапе ПОЛ (1 ч окисления) (рис. 19). При этом изученные тиолы проявляют близкую эффективность антиоксидантного действия при различных способах инициации окисления (автоокисление или ПОЛ, инициированное $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$).

При более длительных сроках окисления антиоксидантная эффективность унитиола снижается, хотя и остается статистически значимой ($p < 0,015$). Глутатион же полностью теряет способность подавлять накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах и даже приобретает прооксидантные свойства. Особенно следует подчеркнуть, что прооксидантное действие глутатиона в условиях автоокисления развивалось быстрее и оказалось более выраженным, чем в случае $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного окисления.

Приведенные данные демонстрируют, что динамика изменения и трансформации антиоксидантного действия тиолов заметно отличается от таковой для липофильных антиоксидантов, как фенольного, так и полиенового типа (см. разд. 4.1).

Механизм действия тиоловых АО, по литературным сведениям, связан как с окислением SH-групп под действием кислородных радикалов, так и со связыванием катионов металлов переходной валентности, которые являются катализаторами образования радикалов, в частности АФК [92]. При взаимодействии с радикалами тиол превращается в соответствующий тиильный радикал, степенью реакционной способности которого определяется, в какой степени этот радикал будет вовлекаться в дальнейшее развитие реакций СРО.

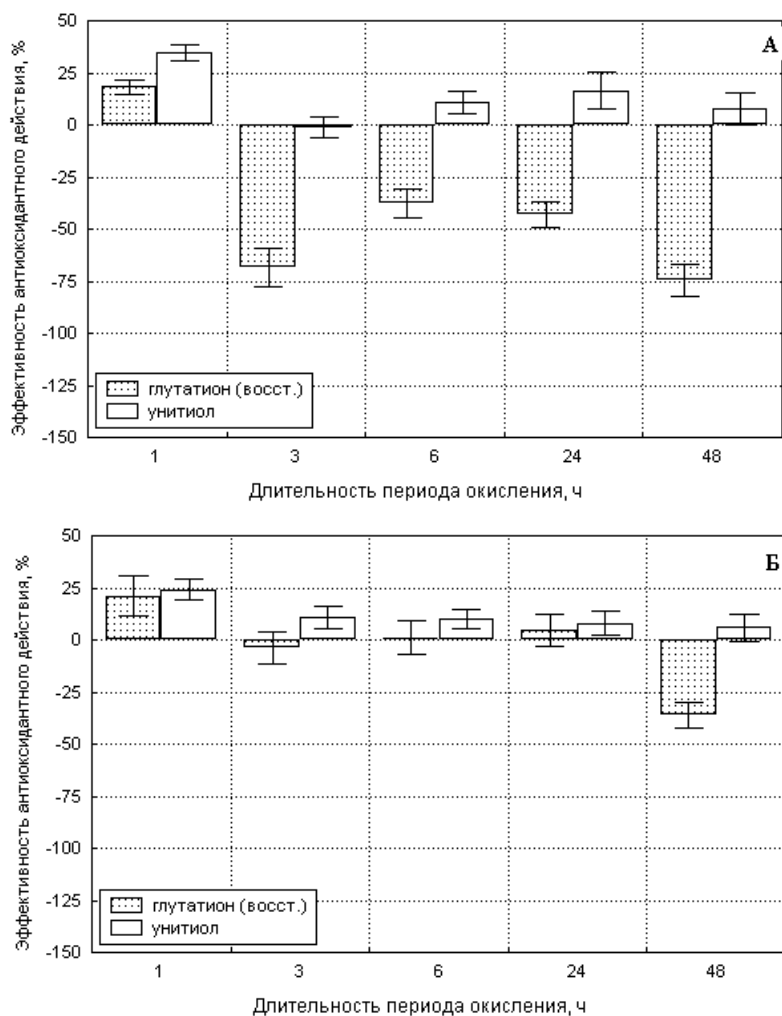


Рисунок 19. Эффективность антиоксидантного действия глутатиона (восстановленная форма) и унитиола (100 мкМ) в липосомах, подвергнутых автоокислению (А) и ПОЛ, индуцированному $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Б). Усреднение данных 3 экспериментов ($M \pm SD$).

В этом смысле быстрая потеря глутатионом антиоксидантных свойств и приобретение им прооксидантных свойств не является неожиданным фактом: известно, что образующиеся при окислении глутатиона тиольные радикалы обладают высокой реакционной способностью, а наибольшая скорость окисления глутатиона наблюдается в присутствии катионов металлов переходной валентности [179]. Тем не менее, мы наблюдаем более выраженное прооксидантное действие глутатиона при автоокислении липосом, а не при Cu^{2+} -индуцированном окислении. Можно предполагать, что такое «аномальное» поведение глутатиона при инициации ПОЛ смесью $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и H_2O_2 связано с протеканием двух противодействующих процессов — с одной стороны, глутатион окисляется до глутатионильного радикала, стимулирующего ПОЛ, с другой стороны, глутатион связывает часть катионов Cu^{2+} в неактивный в отношении участия в реакции Фентона комплекс.

Несколько большая эффективность унитиола может быть связана либо с меньшей реакционной способностью радикального продукта окисления унитиола, либо (или одновременно) со способностью унитиола образовывать более прочные внутримолекулярные комплексы с катионами металлов за счет наличия в молекуле двух SH-групп.

4.2.2. Особенности влияния таурина на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах

Таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) является природным сульфоновым гомологом аминокислот и выполняет в живом организме важную роль в поддержке функционирования различных систем, включая центральную нервную систему. Таурин является активным веществом лекарственного средства Тауфон, который в последние годы находит все более широкое применение в лечении различных заболеваний. Мы изучили влияние таурина в концентрации 100 мкМ на интенсивность ПОЛ в липосомах и обнаружили, что таурин проявляет небольшое, но статистически значимое ($p < 0,008$) ингибирующее действие на накопление карбонильных продуктов ПОЛ на начальных стадиях ПОЛ (как спонтанного, так и индуцированного $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$). На отсроченных этапах ПОЛ таурин в исследованной концентрации оказывает незначительный антиоксидантный эффект при индуцированном

ПОЛ липосом, но полностью теряет антиоксидантные свойства в случае автоокисления (рис. 20).

Механизм слабого антиоксидантного действия таурина не ясен, но, возможно, связан со способностью таурина образовывать комплексные соединения с катионами двухвалентных металлов.

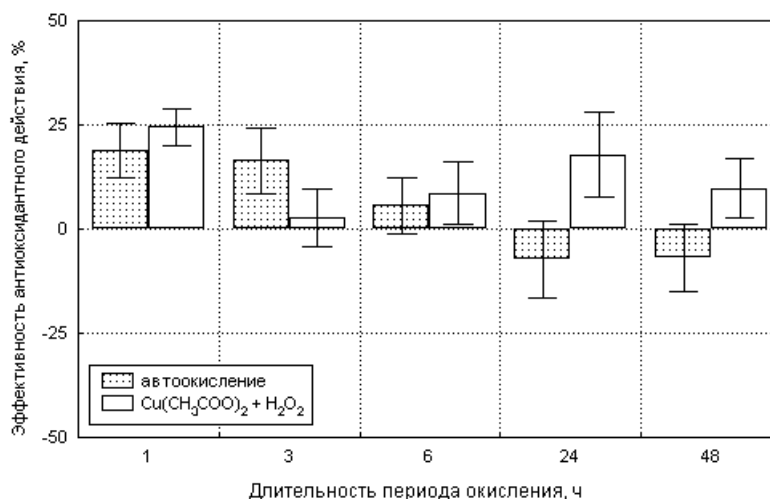


Рисунок 20. Эффективность антиоксидантного действия таурина (100 мкМ) в липосомах, подвергнутых автоокислению и ПОЛ, индуцированному $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$. Усреднение данных 3 экспериментов ($M \pm SD$).

4.2.3. Особенности влияния комплексообразующих карбоновых кислот на накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах

Двух- и трехосновные карбоновые кислоты, способные образовывать достаточно прочные комплексы с катионами металлов, играют важную роль в обмене веществ в живом организме. Кроме того, некоторые из этих кислот используются в виде лекарственных препаратов или пищевых добавок (янтарная кислота), либо их анион является компонентом лекарственных препаратов, выпускающихся в виде солей активного вещества (сукцинат, цитрат). Поэтому вопросы вовлеченности указанных кислот в развитие и контроль интенсивности реакций ПОЛ представляют особый интерес.

Мы исследовали влияние солей янтарной (натрия сукцинат), винной (калия-натрия тартрат) и лимонной (натрия цитрат) кислот в концентрациях 2 и 10 мМ на

накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах при индукции ПОЛ сульфатом или ацетатом меди в присутствии H_2O_2 .

При индукции ПОЛ $CuSO_4 + H_2O_2$ сукцинат и тартрат на начальных этапах окисления (1 и 3 ч) проявляли прооксидантное действие (после 3 ч окисления различия с контролем были статистически значимы, $p < 0,005$). В то же время на отсроченных этапах ПОЛ (после 24 ч окисления) сукцинат, в отличие от тартрата, продемонстрировал слабое антиоксидантное действие. Мы также обнаружили, что тартрат в более высокой концентрации проявляет более выраженный прооксидантный эффект. Цитрат в этих условиях проявлял прооксидантное действие только в концентрации 2 мМ и только на начальных стадиях ПОЛ (рис. 21, А, В).

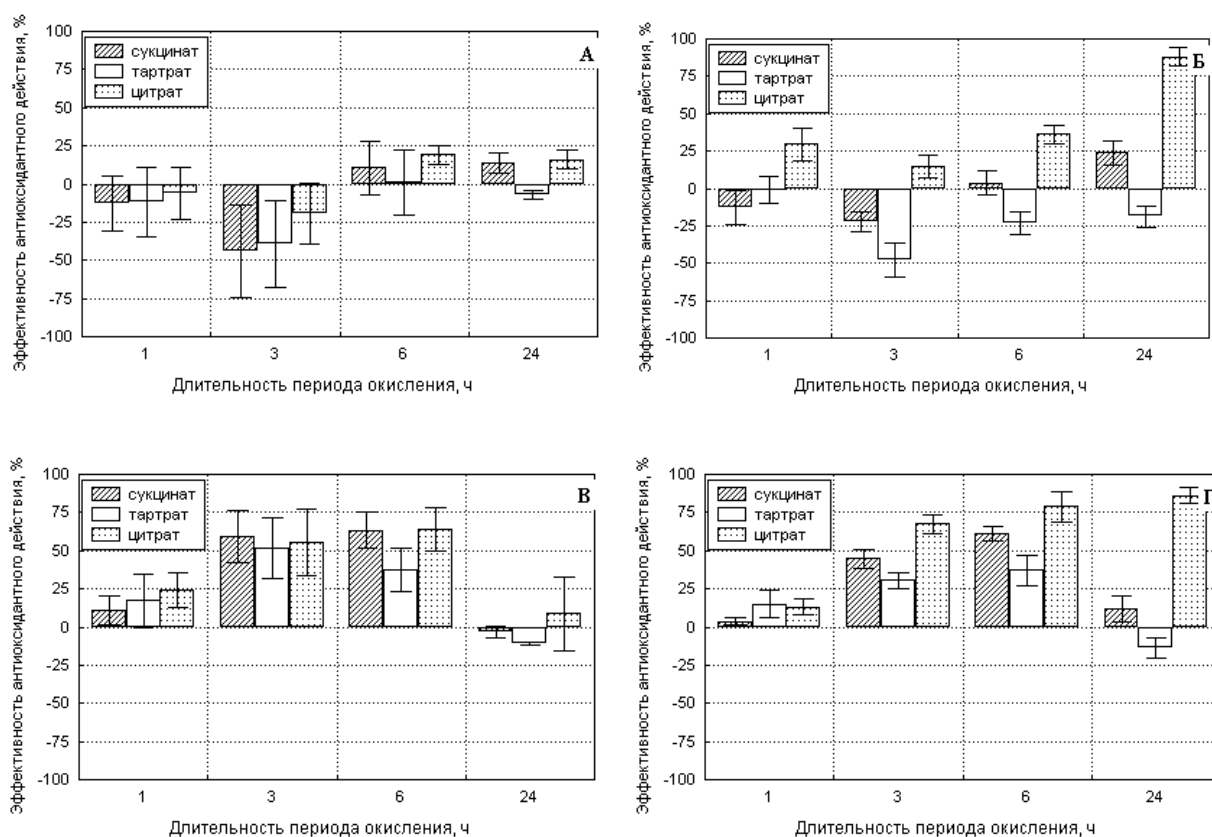


Рисунок 21. Эффективность антиоксидантного действия солей комплексообразующих карбоновых кислот в липосомах, окисление которых инициировали добавлением 2,5 мМ $CuSO_4$ (А, В) или $Cu(CH_3COO)_2$ (Б, Г) в присутствии 0,8 мМ H_2O_2 . Концентрация анионов соответствующих кислот 2 мМ (А, Б) и 10 мМ (В, Г). Усреднение данных 4 экспериментов ($M \pm SD$).

При индукции ПОЛ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ соли всех изученных кислот в той или иной степени проявляли антиоксидантное действие, более выраженное в случае более высокой концентрации солей (10 мМ). Только тартрат на отдельных этапах ПОЛ продемонстрировал слабый прооксидантный эффект (после 24 ч окисления отличия от контроля статистически значимы, $p < 0,01$). Интересно отметить, что наиболее выраженное ингибирование накопления карбонильных продуктов ПОЛ под действием исследованных веществ наблюдалось при средних длительностях окисления (3 и 6 ч), а при более длительно протекавшем окислении (24 ч) антиоксидантные свойства у солей карбоновых кислот нами не обнаруживались. Лишь цитрат в концентрации 10 мМ даже в условиях длительного окисления достоверно ($p < 0,001$) снижал в липосомах содержание карбонильных продуктов ПОЛ по сравнению с контролем (рис. 21, Б, Г).

Поскольку сукцинат, тартрат и цитрат проявляют выраженные комплексообразующие свойства [13], можно предполагать, что проявление этими веществами в определенных условиях антиоксидантных свойств может быть связано с образованием достаточно прочного комплекса с катионами Cu^{2+} . Считается, что хелатированные ионы меди становятся менее доступными для участия в реакции с H_2O_2 [92]. Кроме того, существенную роль может играть размер, гидрофильность и пространственное строение указанных комплексов Cu^{II} , что может затруднять их проникновение в липидную фазу, где катионы Cu^{2+} и/или продукты химических реакций с участием Cu^{2+} могут катализировать разложение гидропероксидов липидов и, соответственно, усиление интенсивности ПОЛ. Тем не менее, соли комплексообразующих карбоновых кислот в определенных условиях и на конкретных временных этапах процесса ПОЛ проявляли в наших экспериментах прооксидантные свойства.

Вполне вероятно, что связывание в комплекс с соответствующими анионами лишь частично препятствует вовлечению Cu^{2+} в реакцию Фентона с продукцией гидроксил-радикала, инициирующего реакции ПОЛ в мембране липосом. Подавление вовлечения ионов меди в реакцию Фентона, видимо, тем слабее, чем менее прочен соответствующий комплекс. Действительно, если сравнить константы устойчивости комплексов изученных карбоновых кислот с Cu^{2+} ($\lg K_1$ для янтарной кислоты равен 2,9, для винной — 3,4, для лимонной — 5,9 [13]), то легко увидеть, что больший антиокси-

дантный эффект в предложенной нами МС продемонстрировал цитрат, имеющий наиболее высокое значение константы устойчивости K_1 .

С другой стороны, анионы двух- и трехосновных карбоновых кислот могут подвергаться радикальному декарбоксилированию [82] и за счет этого, весьма вероятно, обладают способностью в определенной степени стимулировать ПОЛ подобно тому, как это было показано для ацетат-аниона (см. выше).

В заключение данной главы особенно подчеркнем, что нами было впервые обнаружено явление трансформации (инверсии) антиоксидантного действия в прооксидантное в зависимости от длительности периода протекания процесса ПОЛ. Важно отметить, что инверсия антиоксидантных свойств в прооксидантные оказалась свойственной антиоксидантам различной химической природы и различного механизма действия. Такая инверсия была выявлена нами у фенольных соединений, веществ с ненасыщенными С=С-связями, тиолов и карбоновых кислот, способных образовывать комплексы с катионами металлов переходной валентности.

В большинстве случаев указанная инверсия наблюдалась на отсроченных этапах процесса ПОЛ (длительность периода окисления 6 ч и более). Более выраженная трансформация антиоксидантных свойств в прооксидантные при этом обнаруживалась либо при более низкой концентрации антиоксиданта, либо при более высокой начальной интенсивности ПОЛ. Этот факт позволяет предполагать, что инверсия антиоксидантных свойств в прооксидантные наблюдается главным образом на отдаленных этапах ПОЛ потому, что через определенный отрезок времени концентрация изначально введенного антиоксиданта в процессе ПОЛ падает до уровня, перестающего обеспечивать эффективное торможение реакций пропагации и самоусиления цепного процесса ПОЛ.

Для выяснения условий проявления и механизмов развития инверсии антиоксидантных свойств в прооксидантные, а также для решения вопроса о том, является ли такая инверсия характерным неотъемлемым свойством антиоксидантов, требуется проведение дальнейших углубленных исследований.

Приведенные в данной главе примеры исследования особенностей влияния различных химических соединений на интенсивность ПОЛ с использованием разработанной нами липосомальной МС ПОЛ демонстрируют следующее:

- Применение разработанной нами МС ПОЛ на основе липосом позволяет выявить неизвестные ранее особенности действия АО в различных условиях инициации и на различных временных этапах процесса ПОЛ.
- Эффективность антиоксидантного действия АО может существенно отличаться при различных способах инициации ПОЛ, обеспечивающих протекание реакций окисления с различной интенсивностью.
- Эффективность антиоксидантного действия АО может существенно отличаться на различных временных этапах процесса ПОЛ. Профиль эффективности антиоксидантного действия в зависимости от длительности периода окисления характерен для групп веществ, имеющих определенный механизм антиоксидантного действия.
- Липофильные и гидрофильные АО различной химической природы (фенолы, полиены, тиолы, комплексообразующие карбоновые кислоты) на отсроченных этапах ПОЛ в определенных условиях могут демонстрировать трансформацию (инверсию) антиоксидантных свойств в прооксидантные.

Таким образом, результаты наших экспериментов свидетельствуют о возможности выявления особенностей влияния химических соединений на интенсивность ПОЛ в зависимости от природы и механизма действия соответствующих веществ, а также от условий иницирования и протекания и конкретного временного этапа процесса ПОЛ на основе применения разработанной нами липосомальной МС ПОЛ с оценкой интенсивности ПОЛ по накоплению карбонильных соединений, реагирующих с ДНФГ.

Заключение

Первичный скрининг АО, перспективных для использования в качестве лекарственных средств, является достаточно актуальной и важной проблемой. Это связано, в частности, с тем, что окислительный стресс (а точнее, нарушение окислительно-антиоксидантного баланса в организме), наблюдается практически при всех заболеваниях человека и, соответственно, рассматривается сегодня в качестве неспецифического патологического процесса. Однако отсутствие унифицированного подхода к первичному анализу антиоксидантных свойств химических соединений заметно затрудняет сравнение полученных в различных экспериментах результатов. Важным аспектом проблемы является и тот факт, что эффективность действия одного и того же АО существенно различается в зависимости от выбора субстрата окисления и способа инициации ПОЛ. Более того, появление экспериментальных данных о возможности в определенных условиях прооксидантного действия АО подразумевает необходимость еще при скрининге попытаться выявить наличие и условия трансформации (инверсии) антиоксидантных свойств вещества в прооксидантные.

Одним из решений данной проблемы было бы использование унифицированной МС ПОЛ строго контролируемого и регулируемого состава, что позволило бы при незначительных вариациях аналитической процедуры использовать широкий спектр субстратов окисления и способов индукции ПОЛ. На основе анализа большого количества опубликованных данных, мы предложили использовать в качестве основы такой МС фосфатидилхолиновые липосомы, полученные методом инъекции, инициируя окисление липосом термически или солями меди, а интенсивность протекания процесса ПОЛ оценивать по накоплению карбонильных продуктов ПОЛ.

Наиболее широко используемым методом анализа карбонильных продуктов ПОЛ является определение содержания веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ВР-ТБК). Однако проведенные нами эксперименты продемонстрировали, что количество определяемых ВР-ТБК существенно зависит от наличия в среде катионов переходных металлов, а сама ТБК в ходе анализа может непосредственно взаимодействовать с катионами меди. Соответственно, результаты, получаемые данным методом, могут привести к неадекватной оценке уровня ПОЛ в присутствии катионов переходных металлов. Следовательно, при использовании МС ПОЛ с металло-

индуцированным окислением (а это один из наиболее распространенных способов инициации окисления в МС) применение для оценки уровня ПОЛ определения ВР-ТБК нецелесообразно.

В последующих экспериментах мы показали, что для оценки ПОЛ при различных условиях инициации может быть применен другой реактив на карбонильные соединения — 2,4-динитрофенилгидразин (ДНФГ). Наши данные показали, что, в отличие от ТБК, ДНФГ не взаимодействует с катионами переходных металлов, карбонильные соединения, реагирующие с ДНФГ, присутствуют в окисленных липосомах в достаточных количествах, а динамика накопления ДНФГ-реактивных веществ в липосомах качественно сходна с таковой для других продуктов ПОЛ (ВР-ТБК, кротоновый альдегид, конъюгированные диены), то есть адекватно отражает ход окисления липидов. Учитывая специфичность ДНФГ-метода и полноту обнаружения карбонильных продуктов окисления различных видов липидов с его использованием, а также простоту и малую трудоемкость выполнения анализа и доступность реактивов, мы рекомендуем применять метод определения ДНФГ-реактивных карбонильных соединений для оценки ПОЛ в МС.

Изменение концентрации карбонильных соединений в ходе окисления в суспензии липосом было различным в зависимости от использованного способа инициации ПОЛ. Так, при автоокислении концентрация карбонильных соединений незначительно изменялась в первые часы процесса, существенно возрастая к 24-му часу инкубации и достигая максимального значения после 72 ч окисления. Добавление к инкубационной среде солей меди значительно усиливало накопление карбонильных соединений в течение первых 24 ч. При использовании для инициации окисления системы $\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ мы наблюдали еще более интенсивное накопление карбонильных соединений в первые часы инкубации, а максимум их концентрации достигался уже после 24-часового окисления. Дальнейшие наши опыты показали, что интенсификация образования карбонильных продуктов ПОЛ вызывалась наличием ацетат-аниона. Концентрация образующихся карбонильных продуктов ПОЛ, кроме того, линейно зависела от концентрации фосфолипида в суспензии липосом до концентрации 2,38 мг липида/мл суспензии.

Определенной проблемой оказалось закисление суспензии липосом в ходе длительного окисления, наиболее выраженное в условиях автоокисления, поскольку нам не удалось подобрать вещества, которое могло бы служить основой буферного раствора и при этом не влияло бы на интенсивность ПОЛ. Однако, на основании полученных нами данных, мы считаем, что незабуференная суспензия фосфатидилхолиновых липосом может служить основой МС для изучения ПОЛ в ходе длительного окисления (до 24 ч при автоокислении и до 48 ч при медь-зависимой индукции ПОЛ).

Используя предложенную МС ПОЛ (незабуференная суспензия липосом, подвергнутая автоокислению или медь-индуцированному окислению в течение 24 ч, интенсивность ПОЛ в которой определяли по содержанию карбонильных соединений, реагирующих с ДНФГ) мы изучили особенности влияния на интенсивность ПОЛ нескольких веществ различной химической природы с антиоксидантными свойствами, входящих в состав лекарственных средств.

Результаты наших экспериментов выявили две существенные особенности действия АО в предложенной нами МС ПОЛ.

Во-первых, у большинства из изученных АО мы обнаружили неизвестное ранее явление трансформации (инверсии) антиоксидантных свойств в прооксидантные в условиях длительного окисления липосом (3 часа и более). Проявление такой инверсии зависело как от концентрации самого АО, так и от интенсивности процесса ПОЛ. По нашему мнению, вероятность возникновения инверсии действия АО может определяться соотношением концентраций неизмененного АО, промежуточных и конечных продуктов окисления АО, реакционной способностью радикальных продуктов окисления АО и скоростью зарождения новых цепей окисления липидов, однако выяснение тонких механизмов и закономерностей описанного явления требует проведения специальных углубленных исследований. Явление инверсии антиоксидантного действия было выявлено нами у АО различной химической природы — фенолов ионола и пробукола, флавоноида кверцетина, полиненасыщенных витаминов ретинола ацетата и эргокальциферола, тиола глутатиона и карбоновых винной и янтарной кислот.

Другой важной особенностью влияния АО на интенсивность ПОЛ в нашей МС оказался тот факт, что для АО различной химической природы была показана раз-

личная зависимость эффективности антиоксидантного действия от длительности окисления липосом, причем эта зависимость существенно отличалась при конкретных способах инициации ПОЛ.

Так, липофильные АО фенольной природы (ионол, пробукол, кверцетин) в общем случае более эффективно подавляли накопление карбонильных продуктов ПОЛ при автоокислении липосом, чем при их медь-индуцированном окислении. Если концентрация этих АО была достаточной для эффективного подавления ПОЛ, то степень их антиоксидантного эффекта постепенно возрастала, достигая максимальных значений на наиболее отсроченных этапах окисления. В противном случае эффективность фенольных АО возрастала лишь до определенного момента, после чего их антиоксидантные свойства полностью исчезали или трансформировались в прооксидантные.

Липофильные вещества, содержащие несколько ненасыщенных связей (ретинола ацетат, эргокальциферол), были наиболее эффективны на раннем этапе ПОЛ (после 1-часового окисления липосом), причем их ингибирующее действие в отношении накопления карбонильных соединений было сильнее при медь-индуцированном окислении липосом, чем при автоокислении. При дальнейшем развитии процесса ПОЛ такие вещества постепенно теряли антиоксидантные свойства, а впоследствии начинали стимулировать накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах.

Тиолы глутатион и унитиол также наиболее эффективно подавляли накопление карбонильных продуктов ПОЛ после 1-го часа окисления. На более поздних этапах ПОЛ тиолы практически полностью теряли антиоксидантную активность либо начинали проявлять прооксидантные свойства. Сходная с тиолами динамика эффективности антиоксидантного действия была обнаружена у аминосульфокислоты таурина, механизм антиоксидантного эффекта которой к настоящему моменту еще не выяснен.

Характерные особенности антиоксидантного эффекта на различных временных этапах ПОЛ были обнаружены у карбоновых кислот, способных образовывать комплексные соединения с медью. В общем случае, комплексообразующие карбоновые кислоты (янтарная, винная, лимонная) были более эффективны при стимуляции ПОЛ липосом ацетатом меди в сравнении с инициацией ПОЛ сульфатом меди. Эффективность действия изученных кислот повышалась с увеличением их концентрации. Двухосновные кислоты (винная и янтарная) во многих случаях проявляли проокси-

дантное действие, а наибольшая антиоксидантная активность была обнаружена у них при индукции ПОЛ ацетатом меди в присутствии H_2O_2 на промежуточных этапах окисления (после 3 и 6 ч инкубации). Трехосновная лимонная кислота, имеющая существенно более высокую константу устойчивости комплекса с медью, существенно подавляла накопление карбонильных продуктов ПОЛ в липосомах и ни в одном случае не продемонстрировала прооксидантного действия.

Говоря о влиянии карбоновых кислот на процессы ПОЛ нельзя обойти вниманием тот факт, что янтарная и лимонная кислоты в организме человека и животных вовлечены в функционирование цикла Кребса и обнаруживаются в клетках в относительно высоких концентрациях. Обнаруженные нами про- и антиоксидантные эффекты, а также данные о прооксидантном действии аниона уксусной кислоты могут в определенной степени стимулировать пересмотр взглядов об участии тех или иных клеточных метаболитов в усилении и подавлении реакций ПОЛ *in vivo*.

Таким образом, полученные нами данные позволили показать возможность применения разработанной нами МС ПОЛ для выявления и оценки особенностей действия как липофильных, так и гидрофильных АО, на длительно протекающий процесс ПОЛ и расширить представления об особенностях влияния на интенсивность ПОЛ АО различной химической природы.

Основываясь на результатах проведенных нами экспериментов, мы рекомендуем использовать МС на основе фосфатидилхолиновых липосом с инициированием окисления температурным воздействием и добавлением солей меди в присутствии H_2O_2 и с оценкой интенсивности ПОЛ по содержанию карбонильных соединений, взаимодействующих с ДНФГ, для скрининговых исследований по выявлению антиоксидантных свойств у веществ различной химической природы. При этом для адекватного заключения о наличии у вещества антиоксидантных свойств, выявления возможной инверсии антиоксидантных свойств и предварительного заключения об отдаленных эффектах АО эксперименты должны проводиться при длительности окисления липосом не менее 24 ч с измерением содержания карбонильных соединений в липосомах через 1, 3, 6 и 24 ч от момента инициации окисления.

Выводы

1. Разработана простая и доступная химическая модельная система для выявления антиоксидантной активности и первичной оценки особенностей антиоксидантного действия лекарственных препаратов различной химической природы в зависимости от длительности периода окисления в экспериментах *in vitro*.
2. Определение концентрации карбонильных соединений, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином, является простым и воспроизводимым способом оценки интенсивности ПОЛ в липосомальных модельных системах, в том числе при инициации ПОЛ металлами переходной валентности. Использование тиобарбитуровой кислоты для определения продуктов ПОЛ в присутствии металлов переменной валентности приводит к неадекватной оценке интенсивности ПОЛ.
3. Разработан метод скрининга веществ различной химической природы с целью выявления антиоксидантных свойств и уточнения особенностей антиоксидантного действия с использованием модельной системы на основе суспензии фосфатидилхолиновых липосом при различной длительности окисления липосом. Продолжительное окисление липосом (24 ч и более) позволяет обнаружить особенности антиоксидантного действия веществ, не выявляющиеся при малой длительности протекания процессов ПОЛ.
4. Эффективность действия изученных фармакологически активных веществ с антиоксидантным действием существенно изменяется в ходе длительно протекающего процесса ПОЛ в липосомах и зависит от химической природы антиоксиданта, его концентрации и интенсивности ПОЛ, задаваемой способом инициации окисления липосом.
5. Липофильные антиоксиданты фенольной природы более эффективно подавляли накопление карбонильных продуктов ПОЛ при автоокислении липосом, чем при Cu-индуцированном окислении. Эффективность антиоксидантного действия фенольных липофильных антиоксидантов достигает максимума на поздних (24 ч) этапах окисления.
6. Липофильные вещества, содержащие ненасыщенные связи, проявляют максимальную эффективность на раннем этапе ПОЛ (1 ч окисления), и их антиокси-

дантное действие при Cu-индуцированном окислении более выражено, чем при автоокислении.

7. Содержащие серу гидрофильные антиоксиданты наиболее эффективно подавляют ПОЛ на раннем этапе процесса (1 ч окисления). На более поздних этапах антиоксидантное действие таких веществ исчезает.
8. Карбоновые кислоты, способные образовывать комплексы с катионами металлов, в зависимости от их концентрации и от условий протекания процесса ПОЛ проявляют как анти-, так и прооксидантное действие. Наибольшая эффективность антиоксидантного действия комплексообразующих карбоновых кислот наблюдается при средней длительности окисления (3 и 6 ч).
9. Трансформация (инверсия) антиоксидантного действия химических соединений в прооксидантное действие наблюдается на отсроченных этапах ПОЛ (длительность окисления 3 часа и более с момента инициации окисления). Проявление инверсии зависит от химической природы и концентрации антиоксиданта, интенсивности протекания реакций ПОЛ и способа инициации окисления липосом.

Список использованной литературы

1. Альперт Дж.С., Хорн Г.Р. Новое в кардиологии // Международн. ж. мед. практики.– 1998.– № 6.– С.41–46.
2. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация определения перекисей липидов в тесте с ТБК // Лаб. дело.– 1988.– № 11.– С.41–43.
3. Араратян Э.А., Мусаелян М.С., Манучарян М.А., Мкртчян С.Л. Перспективы изыскания антиоксидантов – адаптогенов растительного происхождения // Перекисное окисление липидов в норме и патогенезе различных заболеваний: Сб. научн. трудов – Ереван: Айастан, 1988.– С.24–26.
4. Бабенко Г.А., Гонский Я.И., Антоник И.М., Юркив В.И., Вагилевич В.В., Матияш Ю.М., Максимчук Т.П., Завийский Ю.М., Мицкан М.А., Смолинская В.А., Карплюк З.В., Бабенко И.Г. О роли металлов в процессах свободнорадикального окисления в тканях организма по данным спонтанной и индуцированной хемилюминесценции // Биохемилюминесценция. Тр. МОИП.– Т.58.– М.: Наука, 1983.– С.164–179.
5. Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений.– Киев: Наукова думка, 1976.– 260 с.
6. Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. Роль токоферолов в пероксидном окислении липидов биомембран // Биол. мембраны.– 1998.– Т.15.– № 2.– С.137–167.
7. Васильева О.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Действие антиоксидантов на кинетику цепного окисления липидов в липосомах // Биол. мембраны.– 1998.– Т.15.– № 2.– С.177–183.
8. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН.– 1998.– № 7.– С.43–51.
9. Галкина С.И. Влияние различных форм витамина А и его сочетания с витамином Е на перекисное окисление липидов // Вопр. мед. химии.– 1984.– № 4.– С.91–94.
10. Девис М., Остин Дж., Патридж Д. Витамин С: Химия и биохимия.– М.: Мир, 1999.– 176 с.
11. Деев А.И., Асейчев А.В., Владимиров Ю.А. Свободнорадикальные аспекты катактогенеза // Вестн. РАМН.– 1999.– № 2.– С.22–26.

12. Дёрффель К. Статистика в аналитической химии.– М.: Мир, 1994.– 268 с.
13. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика.– М.: Мир, 1991.– 544 с.
14. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Усп. совр. биологии.– 1993.– Т.113.– Вып.1.– С.71–81.
15. Дудник Л.Б., Храпова Н.Г. Исследование ингибирующей активности билирубина в реакциях свободнорадикального окисления // Биол. мембраны.– 1998.– Т.15.– № 2.– С.184–190.
16. Евстигнеева Е.П., Волков И.М., Чудинова В.В. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран // Биол. мембраны.– 1998.– Т.15.– № 2.– С.119–135.
17. Журавлев А.И. Развитие идей Б.Н.Тарусова о роли цепных процессов в биологии // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. Тр. МОИП.– Т.57.– М.: Наука, 1982.– С.3–36.
18. Журавлев А.И. Спонтанная биохемилюминесценция животных тканей // Биохемилюминесценция. Тр. МОИП.– Т.58.– М.: Наука, 1983.– С.3–29.
19. Калиман П.А., Буланкина Н.И., Ганусова Г.В., Гребенникова Н.П., Охрименко С.М., Яковенко М.Г. Окислительный стресс и адаптация метаболизма у крыс при введении левамизола // Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии: Тр. научн. конф., Санкт-Петербург, 15–17 окт. 1998 г.– СПб., 1998.– С.362–364.
20. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Комаров О.С., Владимиров Ю.А. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лаб. дело.– 1988.– № 5.– С.59–62.
21. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б., Владимиров Ю.А. Антиоксидантная активность сыворотки крови // Вестн. РАМН.– 1999.– № 2.– С.15–22.
22. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз.– СПб.: Питер Пресс, 1995.– 304 с.
23. Ковальский Ю.Г., Ананьева Г.В., Поступаев В.В., Рябцева Е.Г. Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у детей из региона с вы-

- соким содержанием метилмеркаптана // Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии: Тр. научн. конф., Санкт-Петербург, 15–17 окт. 1998 г.– СПб., 1998.– С.435–439.
24. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений.– М.: Химия, 1975.– 360 с.
 25. Кузьменко И.В., Клименко Е.П., Алексеев С.М., Захарова Е.И., Донченко Г.В. Влияние α -токоферола и его аналогов на стабильность мембран митохондрий *in vitro* // Биол. мембраны.– 1994.– Т.11.– № 2.– С.169–173.
 26. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Коновалова Г.Г., Козаченко А.И. Концентрационная инверсия антиоксидантного действия β -каротина. // Свободные радикалы и болезни человека. Сб. тр. научно-практической конф., Смоленск, 19–22 сент. 1999 г.– Смоленск, 1999.– С.66–67.
 27. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.– М., 2000.– 69 с.
 28. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками.– М.: Наука, 1986.– 240 с.
 29. Мохова Н.А., Зайцев В.Г., Закревский В.И. Оценка неспецифического влияния некоторых инсектицидов на перекисное окисление липидов и статус антиоксидантной системы // Волгоградское отделение Российской Академии естественных наук. Альманах–2000.– Волгоград, 2000.– С.109–114.
 30. Накагаки М. Физическая химия мембран.– М.: Мир, 1991.– 255 с.
 31. Пескин А.В. Взаимодействие активного кислорода с ДНК // Биохимия.– 1997.– Т.62.– № 12.– С.1571–1578.
 32. Примак Р.Г., Лебедь О.И. Свойства липосом, адсорбированных монтмориллонитом // Укр. биохим. ж.– 1986.– № 4.– С.35–40.
 33. Профилактический прием витамина Е и β -каротина не снижает частоту повторного инфаркта миокарда и смертность от ишемической болезни сердца у мужчин из группы высокого риска // Международн. ж. мед. практики.– 1998.– № 4.– С.26–27.
 34. Сим Э. Биохимия мембран.– М.: Мир, 1985.– 110 с.

35. Степура И.И., Пилецкая Т.П., Степура В.И., Маскевич С.А. Окислительные превращения тиамин, катализируемые ионами меди и аскорбиновой кислотой. // Биохимия.– 1997.– Т.62.– № 12.– С.1648–1654.
36. Тихонов А.Н. Спиновые метки // Соросовский образовательный ж.– 1998.– № 1.– С.8–15.
37. Ушкалова В.Н., Иоанидис Н.В., Кадочникова Т.Д., Деева З.М. Контроль перекисного окисления липидов – Новосибирск, 1993.– 182 с.
38. Эванз У.Г. Органеллы и мембраны животной клетки // Биологические мембраны. Методы.– М.: Мир, 1990.– С.13–61.
39. Электронный учебник по статистике / StatSoft, Inc.– Москва: StatSoft, Inc., 1999. URL: <http://www.statsoft.ru/home/textbook/default.htm>.
40. Ahsan H., Parveen N., Khan N.U., Hadi S.M. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin // Chem. Biol. Interact.– 1999.– Vol.121.– № 2.– P.161–175.
41. Aruoma O.I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics // Free Radical Biol. Med.– 1996.– Vol.20.– № 5.– P.675–705.
42. Aruoma O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease // J. Amer. Oil Chem. Soc.– 1998.– Vol.75.– P.199–212.
43. Ayres S., Tang M., Subbiah M.T. Estradiol-17 β as an antioxidant: Some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants // J. Lab. Clin. Med.– 1996.– Vol.128.– № 4.– P.367–375.
44. Baba N., Daido H., Kosugi T., Miyake M., Nakajima S. Analysis of glycerophospholipid hydroperoxides by iron spray mass spectrometry // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 1998.– Vol.62.– № 1.– P.160–163.
45. Babiak R.M., Campello A.P., Carnieri E.G., Oliveira M.B. Methotrexate: Pentose cycle and oxidative stress // Cell Biochem. Funct.– 1998.– Vol.16.– № 4.– P.283–293.
46. Batzri S., Korn E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication // Biochim. Biophys. Acta.– 1973.– V.298.– P.1015–1019.
47. Beckman K.B., Ames B.N. Oxidative decay of DNA // J. Biol. Chem.– 1997.– Vol.272.– P.19633–19636.

48. Berger T.M., Polidori M.C., Dabbagh A., Evans P.J., Halliwell B., Morrow J.D., Roberts L.J., Frei B. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma // *J. Biol. Chem.*– 1997.– Vol.272.– P.15656–15660.
49. Berlett B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress // *J. Biol. Chem.*– 1997.– Vol.272.– P.20313–20316.
50. Bigwood T., Delve R., Read G. A novel iron (III) catalyzed degradation of aliphatic aldehydes to their lower homologues with implications for lipid peroxidation chemistry // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*– 1990.– № 10.– P.776–778.
51. Bonnefont-Rousselot D., Segaud C., Jore D., Delattre J., Gardes-Albert M. Antioxidant effect of probucol on $RO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet -}$ -induced peroxidation of human low-density lipoproteins // *Radiat. Res.*– 1999.– Vol.151.– № 3.– P.343–353.
52. Borders C.L. (Jr.), Fridovich I. A comparison of the effects of cyanide, hydrogen peroxide, and phenylglyoxal on eucaryotic and procaryotic Cu,Zn superoxide dismutases // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1985.– Vol.241.– № 2.– P.472–476.
53. Buettner G.R., Jurkiewicz B.A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid // *Radiat. Res.*– 1996.– Vol.145.– № 5.– P.532–541.
54. Burkitt M.J., Milne L. Hydroxyl radical formation from Cu^{II} -trolox mixtures: Insights into the pro-oxidant properties of α -tocopherol // *FEBS Lett.*– 1996.– Vol.379.– № 1.– P.51–54.
55. Bush A.I. Metals and neuroscience // *Curr. Opin. Chem. Biol.*– 2000.– Vol.4.– P.184–191.
56. Cai L., Tsiapalis G., Cherian M.G. Protective role of zinc-metallothionein on DNA damage in vitro by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) and ferric salts // *Chem. Biol. Interact.*– 1998.– Vol.115.– № 2.– P.141–151.
57. Cardoso S.M., Pereira C., Oliveira C.R. The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 1998.– Vol.246.– № 3.– P.703–710.
58. Clare D.A., Duong M.N., Darr D., Archibald F., Fridovich I. Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase // *Anal. Biochem.*– 1984.– Vol.140.– № 2.– P.532–537.

59. Darr D., Fridovich I. Inhibition of catalase by 3,3'-diaminobenzidine // *Biochem. J.*– 1985.– Vol.226.– № 3.– P.781–787.
60. Davies K.J. Oxidative stress: The paradox of aerobic life // *Biochem. Soc. Symp.*– 1995.– Vol.61.– P.1–31.
61. Day B.J., Shawen S., Liochev S.I., Crapo J.D. A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced endothelial cell injury, *in vitro* // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*– 1995.– Vol.275.– № 3.– P.1227–1232.
62. Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation // *Biochem. J.*– 1997.– Vol.324.– P.1–18.
63. Denicola A., Souza J.M., Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1998.– Vol.95.– P.3566–3571.
64. Descampiaux B., Cotellet N., Catteau J.P., Peucelle C., Leroux J.M., Erb F. Cytotoxicity of lindane and paraquat to human hepatoma cell lines // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*– 1999.– Vol.62.– № 1.– P.16–24.
65. De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.M.N., Vermeulen N.P.E. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans // *Free Radical Biol. Med.*– 1999.– Vol.26.– P.202–226.
66. Draper H.H., Squires E.J., Mahmoodi H., Wu J., Agarwal S., Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials // *Free Radical Biol. Med.*– 1993.– Vol.15.– P.353–363.
67. Dyatlov V.A., Makovetskaia V.V., Leonhardt R., Lawrence D.A., Carpenter D.O. Vitamin E enhances Ca²⁺-mediated vulnerability of immature cerebellar granule cells to ischemia // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 7.– P.793–802.
68. Ekström T., Stahl A., Sigvardsson K., Högberg J. Lipid peroxidation *in vivo* monitored as ethane exhalation and malondialdehyde excretion in urine after oral administration of chloroform // *Acta Pharmacol. Toxicol.*– 1986.– Vol.58.– P.289–296.
69. Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review // *Pathol. Biol. Paris.*– 1996.– Vol.44.– № 1.– P.25–28.
70. Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal // *Methods Enzymol.*– 1990.– Vol.186.– P.407–421.

71. Esterbauer H., Lang J., Zdravec S., Slater T.F. Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography // *Methods Enzymol.*– 1984.– Vol.105.– P.319–328.
72. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes // *Free Radical Biol. Med.*– 1991.– Vol.11.– P.81–128.
73. Evans P., Lyras L., Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. // *Methods Enzymol.*– 1999.– Vol.300.– P.145–156.
74. Frei B., Forte T.M., Ames B.N., Cross C.E. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma // *Biochem. J.*– 1991.– Vol.277.– P.133–138.
75. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1986.– Vol.247.– № 1.– P.1–11.
76. Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters // *J. Biol. Chem.*– 1997.– Vol.272.– P.18515–18517.
77. Fridovich I. Oxygen toxicity: A radical explanation // *J. Exp. Biol.*– 1998.– Vol.201.– P.1203–1209.
78. Fuchs J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 7.– P.848–873.
79. Fuchs J., Kern H. Modulation of UV-light-induced skin inflammation by D-alpha-tocopherol and L-ascorbic acid: a clinical study using solar simulated radiation // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 9.– P.1006–1012.
80. Galey J.B., Destree O., Dumats J., Pichaud P., Marche J., Genard S., Braccioli G., Le Capitaine L., Plessix H., Brambilla L., Cantoni O. Protection of U937 cells against oxidative injury by a novel series of iron chelators // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 8.– P.881–890.
81. Gallwitz H., Bonse S., Martinez-Cruz A., Schlichting I., Schumacher K., Krauth-Siegel R.L. Ajoene is an inhibitor and subversive substrate of human glutathione reductase and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase: Crystallographic, kinetic, and spectroscopic studies // *J. Med. Chem.*– 1999.– Vol.42.– № 3.– P.364–372.

82. Goldstein S., Meyerstein D., Czapski G. The Fenton reagents // *Free Radical Biol. Med.*– 1993.– Vol.15.– P.435–445.
83. Gordon M.H., Roedig-Penman A. Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes // *Chem. Phys. Lipids.*– 1998.– Vol.97.– № 1.– P.79–85.
84. Groves J.T. Peroxynitrite: Reactive, invasive and enigmatic // *Curr. Opin. Chem. Biol.*– 1999.– Vol.3.– P.226–235.
85. Guichardant M., Taibi-Tronche P., Fay L.B., Lagarde M. Covalent modifications of aminophospholipids by 4-hydroxynonenal // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 9.– P.1049–1056.
86. Gutteridge J.M.C. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1986.– Vol.869.– P.119–127.
87. Gutteridge J.M.C., Quinlan G.J. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: The important primary role for iron-binding and iron-oxidizing proteins // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1992.– Vol. 1159.– P.248–254.
88. Haber F., Weiss J.J. The catalytic decomposition of H₂O₂ by iron salts // *Proc. R. Soc. London [Biol.]*.– 1934.– Vol.A147.– P.332–351.
89. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant // *Free Radical Res. Commun.*– 1990.– Vol.9.– P.1–32.
90. Halliwell B., Aruoma O.J. DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism and measurement in mammalian systems // *FEBS Lett.*– 1991.– Vol.281.– № 1–2.– P.9–19.
91. Halliwell B., Chirico S. Lipid peroxidation, its mechanism, measurement and significance // *Am. J. Clin. Nutr.*– 1993.– Vol.57.– P.715S–725S.
92. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview // *Methods Enzymol.*– 1990.– Vol.186.– P.1–85.
93. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1990.– Vol.280.– P.1–8.
94. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems // *Free Radical Biol. Med.*– 1995.– Vol.18.– № 1.– P.125–126.

95. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine.– Oxford: Oxford University Press, 1999.
96. Halliwell B., Hu M.L., Louie S., Duvall T.R., Tarkington B.R., Motchnik P., Cross C.E. Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. Antioxidant depletion and oxidative damage // FEBS Lett.– 1992.– Vol.313.– P.62–66.
97. Halpner A.D., Handelman G.J., Harris J.M., Belmont C.A., Blumberg J.B. Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes // Arch. Biochem. Biophys.– 1998.– Vol.359.– № 2.– P.305–309
98. Henle E.S., Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide // J. Biol. Chem.– 1997.– Vol.272.– P.19095–19098.
99. Hermes-Lima M., Nagy E., Ponka P., Schulman H.M. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against $\cdot\text{OH}$ -mediated strand breaks // Free Radical Biol. Med.– 1998.– Vol.25.– № 8.– P.875–880.
100. Hu M.L., Louie S., Cross C.E., Motchnik P., Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma // J. Lab. Clin. Med.– 1992.– Vol.121.– P.257–262.
101. Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring levodopa. Parkinson Study Group // Ann. Neurol.– 1996.– Vol.39.– № 1.– P.37–45.
102. Inanami O., Watanabe Y., Syuto B., Nakano M., Tsuji M., Kuwabara M. Oral administration of (-)catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil // Free Radical Res.– 1998.– Vol.29.– № 4.– P.359–365.
103. Ischiropoulos H., al-Mehdi A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications // FEBS Lett.– 1995.– Vol.364.– P.279–282.
104. Jiang J., Xu Y., Klaunig J.E. Induction of oxidative stress in rat brain by acrylonitrile (ACN) // Toxicol. Sci.– 1998.– Vol.46.– № 2.– P.333–341.
105. Kagan V., Serbinova E., Packer L. Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1990.– Vol.169.– № 3.– P.851–857.

106. Kakkar P., Mehrotra S., Viswanathan P.N. Influence of antioxidants on the peroxidative swelling of mitochondria *in vitro* // Cell. Biol. Toxicol.– 1998.– Vol.14.– № 5.– P.313–321.
107. Kawabata T., Schepkin V., Haramaki N., Phadke R.S., Packer L. Iron coordination by catechol derivative antioxidants // Biochem. Pharmacol.– 1996.– Vol.51.–№ 11.– P.1569–1577.
108. Kissner R., Nauser T., Bugnon P., Lye P.G., Koppenol W.H. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis // Chem. Res. Toxicol.– 1998.– Vol.10.– P.1285–1292.
109. Klein R.A. The detections of oxidation in liposome preparations // Biochim. biophys. acta.– 1970.– Vol.210.– № 3.– P.486–489.
110. Kojima S., Ona S., Iizuka I., Arai T., Mori H., Kubota K. Antioxidative activity of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin and its inhibitory effect on paraquat-induced cell toxicity in cultured rat hepatocytes // Free Radical Res.– 1995.– Vol.23.– № 5.– P.419–430.
111. Kontush A., Meyer S., Finckh B., Kohlschutter A., Beisiegel U. α -Tocopherol as a reductant for Cu(II) in human lipoproteins. Triggering role in the initiation of lipoprotein oxidation // J. Biol. Chem.– 1996.– Vol.271.– № 19.– P.11106–11112.
112. Korytowski W., Geiger P.G., Girotti A.W. Lipid hydroperoxide analysis by high-performance liquid chromatography with mercury cathode electrochemical detection // Methods Enzymol.– 1999.– Vol.300.– P.23–33.
113. Kuhlmann M.K., Burkhardt G., Horsch E., Wagner M., Kohler H. Inhibition of oxidant-induced lipid peroxidation in cultured renal tubular epithelial cells (LLC-PK1) by quercetin // Free Radical Res.– 1998.– Vol.29.– № 5. P.451–460.
114. Lacy F., Gough D.A., Schmid-Schonbein G.W. Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production // Free Radical Biol. Med.– 1998.– Vol.25.– № 6.– P.720–727.
115. Lawrence G.D., Cohen G. Concentrating ethane from breath to monitor lipid peroxidation *in vivo* // Methods Enzymol.– 1984.– Vol. 105.– P.305–311.
116. Lawson J.A., Rokach J., FitzGerald G.A. Isoprostanes: Formation< analysis and use as indices of lipid peroxidation *in vivo* // J. Biol. Chem.– 1999.– Vol.274.– № 35.– P.24441–24444.

117. Lee A.Y., Chung S.S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract // *FASEB J.*– 1999.– Vol.13.– № 1.– P.23–30.
118. Liebler D.C., McClure T.D. Antioxidant reactions of β -carotene: Identification of carotenoid-radical adducts // *Chem. Res. Toxicol.*– 1996.– Vol.9.– № 1.– P.8–11.
119. Liochev S.I., Fridovich I. Lucigenin as mediator of superoxide production: Revisited // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 8.– P.926–928.
120. Mao S.J.T., Yates M.T., Jackson R.L. Antioxidant activity and serum levels of probucol and probucol metabolites // *Methods Enzymol.*– 1994.– Vol.234.– P.505–513.
121. Marla S.S., Lee J. Groves J.T. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1997.– Vol.94.– P.14243–14248.
122. Martin C., Barturen K., Martinez R., Lacort M., Ruiz-Larrea M.B. *In vitro* inhibition by estrogens of the oxidative modifications of human lipoproteins // *J. Physiol. Biochem.*– 1998.– Vol.54.– № 4.– P.195–202.
123. Mates J.M., Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes // *Front. Biosci.*– 1999.– Vol.4.– P.D339–D345.
124. Matsuo T., Shinzawa H., Togashi H., Aoki M., Sugahara K., Saito K., Saito T., Takahashi T., Yamaguchi I., Aoyama M., Kamada H. Highly sensitive hepatitis B surface antigen detection by measuring stable nitroxide radical formation with ESR spectroscopy // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 8.– P.929–935.
125. May J.M., Qu Z., Morrow J.D. Interaction of ascorbate and α -tocopherol in resealed human erythrocyte ghosts. Electron transfer and protection from lipid peroxidation // *J. Biol. Chem.*– 1996.– Vol.271.– № 18.– P.10577–10582.
126. May J.M., Mendiratta S., Hill K.E., Burk R.F. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase // *J. Biol. Chem.*– 1997.– Vol.272.– P.22607–22610.
127. Mayer B., Pfeiffer S., Leopold E., Muller J., Weser U., Schmidt K. Structural and functional analogs of CuZn superoxide dismutase inhibit rat brain nitric oxide synthase by interference with the reductase (diaphorase) domain // *Neurosci. Lett.*– 1996.– Vol.209.– № 3.– P.169–172.

128. Melchiorri D., Reiter R.J., Sewerynek E., Hara M., Chen L., Nistico G. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin // *Biochem. Pharmacol.*– 1996.– Vol.51.– № 8.– P.1095–1099.
129. Miller E.K., Fridovich I. A demonstration that O_2^- is a crucial intermediate in the high quantum yield luminescence of luminol // *Free Radical Biol. Med.*– 1986.– Vol.2.– № 2.– P.107–110.
130. Morel Y., Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress // *Biochem. J.*– 1999.– Vol.342.– P.481–496.
131. Müller A., Sies H. Assay of ethane and pentane from isolated organs and cells // *Methods Enzymol.*– 1984.– Vol.105.– P.311–319.
132. Multhaup G., Ruppert T., Schlicksupp A., Hesse L., Beher D., Masters C.L., Beyreuther K. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease // *Biochem. Pharmacol.*– 1997.– Vol.54.– P.533–539.
133. Nagano T., Fridovich I. Superoxide radical from xanthine oxidase acting upon lumazine // *J. Free Radical Biol. Med.*– 1985.– Vol.1.– № 1.– P.39–42.
134. Naguib Y.M.A. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants // *Anal. Biochem.*– 1998.– Vol.265.– № 2.– P.290–298.
135. Nardini M., Pisu P., Gentili V., Natella F., Di Felice M., Piccolella E., Scaccini C. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937 // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 9.– P.1098–1105.
136. O'Donovan D.J., Katkin J.P., Tamura T., Husser R., Xu X., Smith C.V., Welty S.E. Gene transfer of mitochondrially targeted glutathione reductase protects H441 cells from *t*-butyl hydroperoxide-induced oxidant stresses // *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*– 1999.– Vol.20.– № 2.– P.256–263.
137. Offer T., Mohsen M., Samuni A. An SOD-mimicry mechanism underlies the role of nitroxides in protecting papain from oxidative inactivation // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 7.– P.832–838.
138. Ohshima H., Yoshie Y., Auriol S., Gilibert I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 9.– P.1057–1065.

139. Olson J.A. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids // *J. Nutr.*– 1996.– Vol.126.– № 4, supplement.– P.1208S–1212S.
140. Papas A.M. Oil-soluble antioxidants in foods // *Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Application*. Ong A.S.H., Packer L., editors.– Basel: Birkhauser Verlag, 1992.– P.123–149.
141. Patel M., Day B.J. Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants // *Trends Pharmacol. Sci.*– 1999.– Vol.20.– P.359–364.
142. Pedersen W.A., Cashman N.R., Mattson M.P. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells // *Exp. Neurol.*– 1999.– Vol.155.– № 1.– P.1–10.
143. Picker S.D., Fridovich I. On the mechanism of production of superoxide radical by reaction mixtures containing NADH, phenazine methosulfate, and nitroblue tetrazolium // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1984.– Vol.228.– № 1.– P.155–158.
144. Pippenger C.E., Browne R.W., Armstrong D. Regulatory antioxidant enzymes // *Methods Mol. Biol.*– 1998.– Vol.108.– P.299–313.
145. Plumb G.W., De Pascual-Teresa S., SantosBuelga C., Cheynier V., Williamson G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation // *Free Radical Res.*– 1998.– Vol.29.– № 4.– P.351–358.
146. Pompella A., Comporti M. Imaging of oxidative stress at subcellular level by confocal laser scanning microscopy after fluorescent derivatization of cellular carbonyls // *Amer. J. Pathol.*– 1993.– Vol.142.– № 5.– P.1353–1357.
147. Porter N. Chemistry of lipid peroxidation // *Methods Enzymol.*– 1984. – Vol.105.– P.273–282.
148. Pryor W.A., Castle L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides // *Methods Enzymol.*– 1984.– Vol. 105.– P.293–299.
149. Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase // *Science.*– 1999.– Vol.284.– P.805–808.
150. Ramakrishnan N., Kalinich J.F., McClain D.E. Ebselen inhibition of apoptosis by reduction of peroxides // *Biochem. Pharmacol.*– 1996.– Vol.51.– № 11.– P.1443–1451.

151. Rapola J.M., Virtamo J., Haukka J.K., Heinonen O.P., Albanes D., Taylor P.R., Hut-
tunen J.K. Effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of angina pectoris. A
randomized, double-blind, controlled trial // JAMA.– 1996.– Vol.275.– № 9.– P.693–
698.
152. Reinheckel T., Noack H., Lorenz S., Wiswedel I., Augustin W. Comparison of protein
oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria //
Free Radical Res.– 1998.– Vol.29.– № 4.– P.297–305.
153. Reznick A.Z., Cross C.E., Hu M., Suzuki Y.J., Khwaja S., Safadi A., Motchnik P.A.,
Packer L., Halliwell B. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as meas-
ured by protein carbonyl formation // Biochem. J.– 1992.– Vol.286.– P.607–611.
154. Rice-Evans C.A., Diplock A.T. Current status of antioxidant therapy // Free Radical
Biol. Med.– 1993.– Vol.15.– P.77–96.
155. Rohn T.T., Hinds T.R., Vincenzi F.F. Inhibition of Ca^{2+} -pump ATPase and the
 Na^+/K^+ -pump ATPase by iron-generated free radicals. Protection by 6,7-dimethyl-2,4-
di-1-pyrrolidinyl-7H-pyrrolo[2,3-d] pyrimidine sulfate (U-89843D), a potent, novel,
antioxidant/free radical scavenger // Biochem. Pharmacol.– 1996.– Vol.51.– № 4.–
P.471–476.
156. Rojstaczer N., Triggle D.J. Structure-function relationships of calcium antagonists. Ef-
fect on oxidative modification of low density lipoprotein // Biochem. Pharmacol.–
1996.– Vol.51.– № 2.– P.141–150.
157. Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F. Flavonoids as an-
tioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes // Free Radical
Biol. Med.– 1995.– Vol.19.– P.481–486.
158. Sakagami H., Satoh K., Ida Y., Hosaka M., Arakawa H., Maeda M. Interaction be-
tween sodium ascorbate and dopamine // Free Radical Biol. Med.– 1998.– Vol.25.–
№ 9.– P.1013–1020.
159. Saramet A., Danila G., Paduraru I., Petrariu D., Olinescu R. Direct detection of the an-
tioxidant activity of a new flavonic derivative using the chemiluminescence method //
Arzneimittelforschung.– 1996.– Bd 46.– № 5.– S.501–504.
160. Satoh K., Sakagami H. Effect of cysteine, N-acetyl-L-cysteine and glutathione on cyto-
toxic activity of antioxidants // Anticancer Res.– 1997.– Vol.17.– P.2175–2180.

161. Sayre L.M., Perry G., Smith M.A. Redox metals and neurodegenerative disease // *Curr. Opin. Chem. Biol.*– 1999.– Vol.3.– P.220–225.
162. Scandalios J.G. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses.*– Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory, 1997.
163. Schlotte V., Sevanian A., Hochstein P., Weithmann K.U. Effect of uric acid and chemical analogues on oxidation of human low density lipoprotein *in vitro* // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 7.– P.839–847.
164. Selim S. Separation and quantitative determination of traces of carbonyl compounds as their 2,4-dinitrophenylhydrazones by high-pressure liquid chromatography // *J. Chromatogr.*– 1977.– Vol.136.– P.271–277.
165. Shara M.A., Dickson P.H., Bagchi D., Stohs S.J. Excretion of formaldehyde, malondialdehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, paraquat, endrin and carbon tetrachloride // *J. Chromatogr. B.*– 1992.– Vol.576.– P.221–233.
166. Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications // *Drug Discovery Today.*– 1999.– Vol.4.– № 11.– P.507–517.
167. Slater T.F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation // *Methods Enzymol.*– 1984.– Vol.105.– P.283–293.
168. Souchard J.P., Barbacanne M.A., Margeat E., Maret A., Nepveu F., Arnal J.F. Electron spin resonance detection of extracellular superoxide anion released by cultured endothelial cells // *Free Radical Res.*– 1998.– Vol.29.– № 5.– P.441–449.
169. Squadrito G.L., Pryor W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: The roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– P.392–403.
170. Stadtman E.R., Berlett B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease // *Chem. Res. Toxicol.*– 1997.– Vol.10.– P.485–494.
171. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance // *J. Biol. Chem.*– 1997.– Vol.272.– P.20963–20966.
172. Tadolini B., Franconi F. Carvedilol inhibition of lipid peroxidation. A new antioxidative mechanism // *Free Radical Res.*– 1998.– Vol.29.– № 5.– P.377–387.

173. Tammeveski K., Tenno T.T., Mashirin A.A., Hillhouse E.W., Manning P., McNeil C.J. Superoxide electrode based on covalently immobilized cytochrome c: modelling studies // *Free Radical Biol. Med.*– 1998.– Vol.25.– № 8.– P.973–978.
174. Tang M., Abplanalp W., Ayres S., Subbiah M.T. Superior and distinct antioxidant effects of selected estrogen metabolites on lipid peroxidation // *Metabolism.*– 1996.– Vol.45.– № 4.– P.411–414.
175. Tesoriere L., Bongiorno A., Pintaudi A.M., D'Anna R., D'Arpa D., Livrea M.A. Synergistic interactions between vitamin A and vitamin E against lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1996.– Vol.326.– № 1.– P.57–63.
176. Thielemann L.E., Bosco C., Rodrigo R., Orellana M., Videla L.A. Effects of bromoethylamine on antioxidant capacity, lipid peroxidation, and morphological characteristics of rat liver // *J. Biochem. Mol. Toxicol.*– 1999.– Vol.13.– № 1.– P.47–52.
177. Thomas P.D., Poznansky M.J. A modified tetramethylbenzidine method for measuring lipid hydroperoxides // *Anal. Biochem.*– 1990.– Vol.188.– № 1.– P.226–232.
178. Thomas M.J., Robison T.W., Samuel M., Forman H.J. Detecting and identifying volatile aldehydes as dinitrophenylhydrazones using gas chromatography mass spectrometry // *Free Radical Biol. Med.*– 1995.– Vol.18.– P.553–557.
179. Ueda J., Saito N., Ozawa T. Detection of free radicals produced from reactions of lipid hydroperoxide model compounds with Cu^{II} complexes by ESR spectroscopy // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1996.– Vol.325.– № 1.– P.65–76.
180. Valentine J.S., Wertz D.L., Lyons T.J., Liou L.-L., Goto J.J., Gralla E.B. The dark side of dioxygen biochemistry // *Curr. Opin. Chem. Biol.*– 1998.– Vol.2.– P.253–262.
181. Walke M., Beckert D., Lasch J. Interaction of UV light-induced alpha-tocopherol radicals with lipids detected by an electron spin resonance prooxidation effect // *Photochem. Photobiol.*– 1998.– Vol.68.– № 4.– P.502–510.
182. Wallig M.A. Xenobiotic metabolism, oxidant stress and chronic pancreatitis. Focus on glutathione // *Digestion.*– 1998.– Vol.59.– Suppl.4.– P.13–24.
183. Wardman P., Candeias L.P. Fenton chemistry: An introduction // *Radiat. Res.*– 1996.– Vol.145.– P.523–531.

184. Wede I., Altindag Z.Z., Widner B., Wachter H., Fuchs D. Inhibition of xanthine oxidase by pterins // *Free Radical Res.*– 1998.– Vol.29.– № 4.– P.331–338.
185. Wiseman H., Cannon M., Arnstein H.R.V. Tamoxifen inhibits RNA and protein synthesis simultaneously in *Saccharomyces cerevisiae*: Partial protection by antioxidants // *Biochem. Soc. Trans.*– 1990.– Vol.18.– № 5.– P.877–878.
186. Witting P., Pettersson K., Ostlund-Lindqvist A.M., Westerlund C., Wagberg M., Stocker R. Dissociation of atherogenesis from aortic accumulation of lipid hydro(pero)xides in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits // *J. Clin. Invest.*– 1999.– Vol.104.– № 2.– P.213–220.
187. Wu T.W., Fung K.P., Wu J., Yang C.C., Weisel R.D. Antioxidation of human low density lipoprotein by unconjugated and conjugated bilirubins // *Biochem. Pharmacol.*– 1996.– Vol.51.– № 6.– P.859–862.
188. Yagi K., Ishida N., Komura S., Ohishi N., Kusai M., Kohno M. Generation of hydroxyl radical from linolenic acid hydroperoxide in the presence of epinephrine and iron // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 1992.– Vol.183.– № 3.– P.945–951.
189. Yagi K., Komura S., Ishida N., Nagata N., Kohno M., Ohishi N. Generation of hydroxyl radical from lipid hydroperoxides contained in oxidatively modified low-density lipoprotein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 1993.– Vol.190.– № 2.– P.386–390.
190. Yamamoto Y., Niki E. Presence of cholesteryl ester hydroperoxide in human blood plasma // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 1989.– Vol.165.– № 3.– P.988–993.
191. Yamamoto Y., Niki E., Kamiya Y., Shimasaki H. Oxidation of lipids. 7. Oxidation of phosphatidylcholines in homogeneous solution and in water dispersion. // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1984.– Vol.795.– P.332–340.
192. Yan L.J., Traber M.G., Kobuchi H., Matsugo S., Tritschler H.J., Packer L. Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1996.– Vol.327.– № 2.– P.330–334.
193. Yang W.L., Sun A.Y. Paraquat-induced cell death in PC12 cells // *Neurochem. Res.*– 1998.– Vol.23.– № 11.– P.1387–1394.
194. Yim M.B., Kang J.H., Yim H.S., Kwak H.S., Chock P.B., Stadtman E.R. A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase

- mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in K_m for hydrogen peroxide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1996.– Vol.93.– № 12.– P.5709–5714.
195. Zaugg W.S. Spectroscopic characteristics and some chemical properties of N-methylphenazinium methyl sulfate (phenazine methosulfate) and pyocyanine at the semiquinoid oxidation level // J. Biol. Chem.– 1964.– Vol.239.– № 11.– P.3964–3970.

Приложение 1. Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений, образующихся при ПОЛ липосом в зависимости от способа инициации и длительности периода окисления

Достоверность различий между средними величинами рассчитывали с использованием дисперсионного анализа ANOVA. Нулевая гипотеза: средние выборочные величины двух выборок достоверно не отличимы.

В таблицах приведены расчетные значения параметра p , величина которого соответствует вероятности достоверности нулевой гипотезы. В соответствии с рекомендациями, изложенными в [12], при значении $p < 0,01$ мы полагали различия между средними величинами двух выборок статистически достоверными (выделены в таблицах **полужирным шрифтом**); при $0,01 < p < 0,05$ различия между средними считали сомнительными (спорными) (выделены *полужирным курсивом*), а при $p > 0,05$ — незначимыми (приведены в таблицах обычным шрифтом).

Условные обозначения, принятые в таблицах Приложения 1.

A – автоокисление

HP – индукция ПОЛ добавлением H_2O_2 (0,8 мМ)

CS – индукция ПОЛ добавлением $CuSO_4$ (2,5 мМ)

CSHP – индукция ПОЛ добавлением $CuSO_4$ (2,5 мМ) и H_2O_2 (0,8 мМ)

CA – индукция ПОЛ добавлением $Cu(CH_3COO)_2$ (2,5 мМ)

CAHP – индукция ПОЛ добавлением $Cu(CH_3COO)_2$ (2,5 мМ) и H_2O_2 (0,8 мМ)

Таблица П.1.1.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом через 1 час окисления в зависимости от способа инициации ПОЛ

	A	HP	CS	CSHP	CA	CAHP
A	X	0,008133	0,703135	0,002401	0,004399	1,26·10⁻¹⁰
HP		X	0,016142	0,992044	0,681515	0,010111
CS			X	0,016197	0,034127	0,000048
CSHP				X	0,628080	0,000974
CA					X	0,000060
CAHP						X

Таблица П.1.2.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом через 3 часа окисления в зависимости от способа инициации ПОЛ

	A	HP	CS	CSHP	CA	CAHP
A	X	0,009477	0,114629	0,000111	1,03·10⁻⁹	7,00·10⁻¹⁹
HP		X	0,177560	0,384575	0,047798	0,000003
CS			X	0,041005	0,000257	1,20·10⁻⁹
CSHP				X	0,389127	4,24·10⁻⁷
CA					X	7,06·10⁻¹¹
CAHP						X

Таблица П.1.3.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом через 6 часов окисления в зависимости от способа инициации ПОЛ

	A	HP	CS	CSHP	CA	CAHP
A	X	0,000300	0,005674	0,000162	8,51·10⁻¹⁵	2,04·10⁻²⁰
HP		X	0,419408	0,556853	0,001111	1,34·10⁻⁷
CS			X	0,175412	5,85·10⁻⁶	1,72·10⁻¹⁰
CSHP				X	0,010195	2,50·10⁻⁷
CA					X	3,25·10⁻⁸
CAHP						X

Таблица П.1.4.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом через 24 часа окисления в зависимости от способа инициации ПОЛ

	A	HP	CS	CSHP	CA	CAHP
A	X	0,427457	0,002446	0,000252	1,53·10⁻⁶	1,93·10⁻⁷
HP		X	0,053558	0,016121	0,006416	0,003020
CS			X	0,485371	0,726714	0,443394
CSHP				X	0,619995	0,975500
CA					X	0,521807
CAHP						X

Таблица П.1.5.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом через 48 часов окисления в зависимости от способа инициации ПОЛ

	A	HP	CS	CSHP	CA	CAHP
A	X	0,809212	0,273196	0,258608	0,720845	0,466287
HP		X	0,135105	0,125195	0,445276	0,454228
CS			X	0,961776	0,120343	0,454676
CSHP				X	0,106637	0,429891
CA					X	0,598788
CAHP						X

Таблица П.1.6.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом через 72 часа окисления в зависимости от способа инициации ПОЛ

	A	HP	CS	CSHP	CA	CAHP
A	X	0,231931	<i>0,019024</i>	<i>0,025648</i>	0,000003	0,000018
HP		X	0,138616	0,127319	0,000048	0,002704
CS			X	0,796009	0,000176	0,003202
CSHP				X	0,000798	<i>0,010910</i>
CA					X	0,406779
CAHP						X

Таблица П.1.7.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом через 96 часов окисления в зависимости от способа инициации ПОЛ

	A	HP	CS	CSHP	CA	CAHP
A	X	0,363595	0,562546	0,558155	0,406021	<i>0,023176</i>
HP		X	0,338716	0,327023	0,001569	0,004267
CS			X	0,977225	0,000996	0,006124
CSHP				X	0,000694	0,005954
CA					X	<i>0,010894</i>
CAHP						X

Таблица П.1.8.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых автоокислению, в зависимости от длительности периода окисления

	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
1 ч	X	<i>0,043627</i>	0,000039	$2,29 \cdot 10^{-21}$	$3,98 \cdot 10^{-20}$	$< 1 \cdot 10^{-30}$	$3,18 \cdot 10^{-21}$
3 ч		X	<i>0,015953</i>	$3,65 \cdot 10^{-18}$	$3,08 \cdot 10^{-17}$	$2,97 \cdot 10^{-28}$	$1,34 \cdot 10^{-17}$
6 ч			X	$1,09 \cdot 10^{-14}$	$3,61 \cdot 10^{-14}$	$2,48 \cdot 10^{-22}$	$6,12 \cdot 10^{-14}$
24 ч				X	0,001076	$2,02 \cdot 10^{-7}$	0,001180
48 ч					X	<i>0,036159</i>	<i>0,043618</i>
72 ч						X	0,645026
96 ч							X

Таблица П.1.9.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых окислению в присутствии 0,8 мМ Н₂О₂, в зависимости от длительности периода окисления

	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
1 ч	X	0,186647	0,002891	0,000020	0,000010	1,21·10⁻⁸	8,48·10⁻⁸
3 ч		X	0,029785	0,000168	0,000098	4,27·10⁻⁷	0,000002
6 ч			X	0,000627	0,000285	0,000003	0,000009
24 ч				X	0,194536	0,007993	0,010948
48 ч					X	0,057742	0,082679
72 ч						X	0,755408
96 ч							X

Таблица П.1.10.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых окислению в присутствии 2,5 мМ CuSO₄, в зависимости от длительности периода окисления

	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
1 ч	X	0,04270	0,000790	4,07·10⁻¹⁰	1,23·10⁻⁹	4,80·10⁻¹³	3,74·10⁻¹²
3 ч		X	0,016192	1,12·10⁻⁹	2,82·10⁻⁹	7,29·10⁻¹²	9,68·10⁻¹¹
6 ч			X	5,20·10⁻⁸	7,47·10⁻⁸	2,22·10⁻⁸	2,76·10⁻⁷
24 ч				X	0,088523	0,049088	0,104437
48 ч					X	0,985001	0,885371
72 ч						X	0,687528
96 ч							X

Таблица П.1.11.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых окислению в присутствии 2,5 мМ CuSO₄ и 0,8 мМ H₂O₂, в зависимости от длительности периода окисления

	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
1 ч	X	0,020257	0,001423	$3,12 \cdot 10^{-12}$	$5,49 \cdot 10^{-11}$	$1,02 \cdot 10^{-11}$	$5,32 \cdot 10^{-12}$
3 ч		X	0,066612	$6,30 \cdot 10^{-10}$	$7,24 \cdot 10^{-9}$	$2,94 \cdot 10^{-7}$	$2,45 \cdot 10^{-8}$
6 ч			X	$8,26 \cdot 10^{-8}$	$4,17 \cdot 10^{-7}$	0,000006	0,000006
24 ч				X	0,188072	0,248382	0,253217
48 ч					X	0,873099	0,849486
72 ч						X	0,933262
96 ч							X

Таблица П.1.12.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых окислению в присутствии 2,5 мМ Cu(CH₃COO)₂, в зависимости от длительности периода окисления

	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
1 ч	X	$1,47 \cdot 10^{-7}$	$7,83 \cdot 10^{-17}$	$8,52 \cdot 10^{-26}$	$3,56 \cdot 10^{-23}$	$1,74 \cdot 10^{-20}$	$1,97 \cdot 10^{-20}$
3 ч		X	$2,71 \cdot 10^{-11}$	$9,11 \cdot 10^{-25}$	$2,39 \cdot 10^{-22}$	$2,63 \cdot 10^{-18}$	$2,47 \cdot 10^{-18}$
6 ч			X	$3,12 \cdot 10^{-20}$	$2,41 \cdot 10^{-18}$	$5,36 \cdot 10^{-13}$	$4,02 \cdot 10^{-13}$
24 ч				X	0,685642	0,588435	0,703352
48 ч					X	0,411625	0,505665
72 ч						X	0,645568
96 ч							X

Таблица П.1.13.

Уровни статистической значимости отличий выборочных средних величин концентраций карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых окислению в присутствии 2,5 мМ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и 0,8 мМ H_2O_2 , в зависимости от длительности периода окисления

	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
1 ч	X	$5,27 \cdot 10^{-10}$	$2,85 \cdot 10^{-18}$	$2,22 \cdot 10^{-27}$	$1,95 \cdot 10^{-20}$	$1,58 \cdot 10^{-16}$	$1,22 \cdot 10^{-11}$
3 ч		X	$5,21 \cdot 10^{-8}$	$1,88 \cdot 10^{-21}$	$1,40 \cdot 10^{-15}$	$2,54 \cdot 10^{-12}$	$3,82 \cdot 10^{-7}$
6 ч			X	$3,48 \cdot 10^{-15}$	$1,30 \cdot 10^{-10}$	$3,05 \cdot 10^{-8}$	0,004322
24 ч				X	0,647726	0,116336	0,000520
48 ч					X	0,200961	0,009509
72 ч						X	0,036457
96 ч							X

Приложение 2. Зависимость содержания карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых индуцированному окислению, от концентрации ацетата натрия в инкубационной среде.

Таблица П.2.1

Содержание карбонильных соединений в суспензии липосом (2,38 мг липида/мл), подвергнутых индуцированному 2,5 мМ CuSO₄ окислению, в зависимости от концентрации ацетата натрия в инкубационной среде

Длительность окисления, ч	Концентрация ацетата натрия в инкубационной среде, мМ				
	отсутствует	0,2	1	2,5	5
1	0,111 ± 0,012	0,099 ± 0,005 <i>p</i> = 0,1144	0,122 ± 0,009 <i>p</i> = 0,1928	0,120 ± 0,008 <i>p</i> = 0,2585	0,147 ± 0,015 <i>p</i> = 0,0095
3	0,173 ± 0,019	0,172 ± 0,015 <i>p</i> = 0,9368	0,212 ± 0,011 <i>p</i> = 0,0120	0,203 ± 0,008 <i>p</i> = 0,0270	0,277 ± 0,023 <i>p</i> = 0,0004
6	0,308 ± 0,024	0,462 ± 0,038 <i>p</i> = 0,0005	0,764 ± 0,087 <i>p</i> = 0,0001	0,944 ± 0,146 <i>p</i> = 0,0001	1,254 ± 0,315 <i>p</i> = 0,0010
24	1,210 ± 0,037	1,328 ± 0,057 <i>p</i> = 0,0133	1,368 ± 0,062 <i>p</i> = 0,0047	1,366 ± 0,029 <i>p</i> = 0,0006	1,514 ± 0,035 <i>p</i> < 0,0001
48	1,379 ± 0,053	1,383 ± 0,052 <i>p</i> = 0,9177	1,356 ± 0,062 <i>p</i> = 0,5932	1,336 ± 0,040 <i>p</i> = 0,2429	1,266 ± 0,097 <i>p</i> = 0,0869

Усреднение результатов 4 экспериментов. Данные приведены в виде $M \pm SD$ с указанием уровня статистической значимости отличий относительно контроля (без добавления ацетата натрия в инкубационной среде).

Содержание карбонильных соединений в суспензии липосом (2,38 мг липида/мл), подвергнутых индуцированному 2,5 мМ CuSO₄ + 0,8 мМ H₂O₂ окислению, в зависимости от концентрации ацетата натрия в инкубационной среде

Длительность окисления, ч	Концентрация ацетата натрия в инкубационной среде, мМ				
	отсутствует	0,2	1	2,5	5
1	0,158 ± 0,021	0,160 ± 0,010 <i>p</i> = 0,8691	0,163 ± 0,011 <i>p</i> = 0,6878	0,230 ± 0,028 <i>p</i> = 0,0063	0,340 ± 0,035 <i>p</i> = 0,0001
3	0,273 ± 0,029	0,309 ± 0,018 <i>p</i> = 0,0794	0,406 ± 0,037 <i>p</i> = 0,0013	0,471 ± 0,048 <i>p</i> = 0,0004	0,609 ± 0,123 <i>p</i> = 0,0018
6	0,409 ± 0,041	0,512 ± 0,047 <i>p</i> = 0,0163	0,882 ± 0,117 <i>p</i> = 0,0003	1,133 ± 0,102 <i>p</i> < 0,0001	1,468 ± 0,209 <i>p</i> = 0,0001
24	1,279 ± 0,042	1,275 ± 0,021 <i>p</i> = 0,8703	1,311 ± 0,028 <i>p</i> = 0,2518	1,350 ± 0,058 <i>p</i> = 0,0946	1,438 ± 0,071 <i>p</i> = 0,0084
48	1,388 ± 0,041	1,380 ± 0,066 <i>p</i> = 0,8437	1,327 ± 0,055 <i>p</i> = 0,1257	1,305 ± 0,085 <i>p</i> = 0,1291	1,408 ± 0,052 <i>p</i> = 0,5679

Усреднение результатов 4 экспериментов. Данные приведены в виде $M \pm SD$ с указанием уровня статистической значимости отличий относительно контроля (без добавления ацетата натрия в инкубационной среде).

Приложение 3. Коэффициенты линейной корреляции Пирсона между концентрацией карбонильных продуктов в ходе окисления фосфатидилхолиновых липосом и концентрацией липида.

Коэффициенты линейной корреляции Пирсона r между содержанием карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых спонтанному и $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированному окислению при 37°C , и концентрацией липида с указанием уровней достигнутой статистической значимости p .

Таблица П.3.1

Длительность окисления, ч	Автоокисление	Индукцированное ПОЛ
1	$r = 0,9801$ ($p = 0,020$)	$r = 0,9898$ ($p = 0,010$)
3	$r = 0,9825$ ($p = 0,017$)	$r = 0,9960$ ($p = 0,004$)
24	$r = 0,9752$ ($p = 0,025$)	$r = 0,9590$ ($p = 0,041$)
48	$r = 0,9796$ ($p = 0,020$)	$r = 0,9849$ ($p = 0,015$)
96	$r = 0,9819$ ($p = 0,018$)	$r = 0,9778$ ($p = 0,022$)

Приложение 4. Влияние буферного раствора на основе MES – NaOH на содержание карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых спонтанному индуцированному окислению.

Таблица П.4.1

Содержание карбонильных соединений в суспензии липосом (2,38 мг липида/мл), приготовленных на дистиллированной воде (– MES) и на буферном растворе MES–NaOH (20 мМ, рН 6,8) (+ MES), в зависимости от способа инициации окисления

Инициация ПОЛ	Длительность периода окисления, ч							
	1		3		6		24	
	– MES	+ MES	– MES	+ MES	– MES	+ MES	– MES	+ MES
автоокисление	0,121 ± 0,024	0,152 ± 0,016	0,144 ± 0,011	0,272 ± 0,023	0,180 ± 0,017	0,279 ± 0,029	0,889 ± 0,034	1,082 ± 0,077
	p = 0,0752		p = 0,0001		p = 0,0011		p = 0,0037	
2,5 мМ CuSO ₄	0,118 ± 0,023	0,188 ± 0,022	0,182 ± 0,025	0,340 ± 0,042	0,298 ± 0,015	0,417 ± 0,031	1,217 ± 0,033	1,658 ± 0,106
	p = 0,0046		p = 0,0006		p = 0,0005		p = 0,0002	
2,5 мМ CuSO ₄ + 0,8 мМ H ₂ O ₂	0,165 ± 0,012	0,215 ± 0,023	0,271 ± 0,024	0,452 ± 0,051	0,402 ± 0,051	0,764 ± 0,083	1,277 ± 0,054	1,542 ± 0,062
	p = 0,0084		p = 0,0007		p = 0,0003		p = 0,0007	
2,5 мМ Cu(CH ₃ COO) ₂	0,160 ± 0,033	0,183 ± 0,032	0,302 ± 0,011	0,399 ± 0,024	0,569 ± 0,040	0,624 ± 0,039	1,238 ± 0,023	1,261 ± 0,038
	p = 0,3556		p = 0,0003		p = 0,0965		p = 0,3403	
2,5 мМ Cu(CH ₃ COO) ₂ + 0,8 мМ H ₂ O ₂	0,322 ± 0,020	0,328 ± 0,030	0,551 ± 0,032	0,478 ± 0,044	0,789 ± 0,045	0,817 ± 0,049	1,281 ± 0,056	1,223 ± 0,040
	p = 0,3236		p = 0,0364		p = 0,4322		p = 0,1429	

Усреднение результатов 4 экспериментов. Данные приведены в виде $M \pm SD$ с указанием уровня статистической значимости отличий содержания карбонильных соединений в суспензии липосом, приготовленной на MES–NaOH-буфере (+ MES), от такового в суспензии липосом, приготовленной на дистиллированной воде (– MES).

Приложение 5. Влияние буферных растворов (рН 6,0) на основе карбоновых кислот на содержание карбонильных соединений в суспензии липосом, подвергнутых индуцированному окислению.

Таблица П.5.1

Содержание карбонильных соединений в суспензии липосом (2,38 мг липида/мл), подвергнутых индуцированному 2,5 мМ CuSO₄ + 0,8 мМ H₂O₂ окислению в присутствии буферных растворов на основе карбоновых кислот

Буферный раствор	Длительность периода окисления, ч			
	1	3	6	24
нет	0,176 ± 0,021	0,259 ± 0,030	0,421 ± 0,022	1,261 ± 0,049
Ацетатный, 2 мМ	0,190 ± 0,018 <i>p</i> = 0,3504	0,446 ± 0,088 <i>p</i> = 0,0069	1,045 ± 0,201 <i>p</i> = 0,0008	1,719 ± 0,033 <i>p</i> < 0,0001
Ацетатный, 10 мМ	0,252 ± 0,019 <i>p</i> = 0,0017	0,820 ± 0,041 <i>p</i> < 0,0001	1,518 ± 0,082 <i>p</i> < 0,0001	1,818 ± 0,099 <i>p</i> = 0,0001
Сукцинатный, 2 мМ	0,198 ± 0,043 <i>p</i> = 0,3933	0,373 ± 0,070 <i>p</i> = 0,0242	0,375 ± 0,042 <i>p</i> = 0,1004	1,090 ± 0,066 <i>p</i> = 0,0059
Сукцинатный, 10 мМ	0,198 ± 0,016 <i>p</i> = 0,1466	0,318 ± 0,022 <i>p</i> = 0,0193	0,407 ± 0,026 <i>p</i> = 0,4425	0,962 ± 0,083 <i>p</i> = 0,0008
Цитратный, 2 мМ	0,185 ± 0,034 <i>p</i> = 0,6682	0,308 ± 0,036 <i>p</i> = 0,0815	0,342 ± 0,026 <i>p</i> = 0,0035	1,060 ± 0,044 <i>p</i> = 0,0009
Цитратный, 10 мМ	0,125 ± 0,019 <i>p</i> = 0,0113	0,221 ± 0,015 <i>p</i> = 0,0640	0,270 ± 0,021 <i>p</i> = 0,0001	0,152 ± 0,031 <i>p</i> < 0,0001

Усреднение результатов 4 экспериментов. Данные приведены в виде $M \pm SD$ с указанием уровня статистической достоверности отличий содержания карбонильных соединений в суспензии липосом, приготовленной на основе указанного в соответствующей строке таблице буферного раствора, от такового в незабуференной суспензии липосом.

Таблица П.5.2

Содержание карбонильных соединений в суспензии липосом (2,38 мг липида/мл), подвергнутых индуцированному 2,5 мМ $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + 0,8 \text{ мМ } \text{H}_2\text{O}_2$ окислению в присутствии буферных растворов на основе карбоновых кислот

Буферный раствор	Длительность периода окисления, ч			
	1	3	6	24
нет	0,314 ± 0,019	0,569 ± 0,036	0,769 ± 0,018	1,254 ± 0,044
Ацетатный, 2 мМ	0,395 ± 0,029 p = 0,0034	0,662 ± 0,033 p = 0,0089	0,835 ± 0,043 <i>p = 0,0299</i>	1,281 ± 0,026 p = 0,3314
Ацетатный, 10 мМ	0,422 ± 0,023 p = 0,0004	1,093 ± 0,045 p < 0,0001	1,089 ± 0,029 p < 0,0001	1,258 ± 0,030 p = 0,8855
Сукцинатный, 2 мМ	0,280 ± 0,017 <i>p = 0,0372</i>	0,230 ± 0,039 p < 0,0001	0,218 ± 0,020 p < 0,0001	1,299 ± 0,038 p = 0,1726
Сукцинатный, 10 мМ	0,303 ± 0,024 p = 0,4993	0,317 ± 0,023 p < 0,0001	0,301 ± 0,025 p < 0,0001	1,108 ± 0,040 p = 0,0027
Цитратный, 2 мМ	0,238 ± 0,019 p = 0,0013	0,253 ± 0,051 p = 0,0001	0,278 ± 0,012 p < 0,0001	1,144 ± 0,076 <i>p = 0,0462</i>
Цитратный, 10 мМ	0,272 ± 0,024 <i>p = 0,0336</i>	0,188 ± 0,022 p < 0,0001	0,164 ± 0,024 p < 0,0001	0,173 ± 0,037 p < 0,0001

Усреднение результатов 4 экспериментов. Данные приведены в виде $M \pm SD$ с указанием уровня статистической достоверности отличий содержания карбонильных соединений в суспензии липосом, приготовленной на основе указанного в соответствующей строке таблице буферного раствора, от такового в незабуференной суспензии липосом.