

## ОЦЕНКА УРОВНЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПО ИЗМЕНЕНИЮ КИНЕТИКИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СЛЮНЫ

Бельская Л.В., Сарф Е.А.

Омский государственный педагогический университет  
ул. Набережная Тухачевского, 14, г. Омск, 644043, РФ; e-mail: Ludab2005@mail.ru  
Поступила в редакцию: 16.07.2018.

**Аннотация.** Окислительный стресс является нарушением баланса между системой генерации активных форм кислорода и звеном антиоксидантной защиты и при его оценке требуется количественное описание обеих составляющих. Цель исследования - определение потенциальной возможности использования метода кинетической хемилюминесценции для оценки уровня окислительного стресса в слюне. Показано, что при увеличении количества вводимой в систему слюны наблюдается пропорциональное уменьшение свечения в системе АБАП + люминол. Отличительной особенностью развития кривых хемилюминесценции слюны по сравнению с плазмой крови является участок после расходования всех антиоксидантов. В случае плазмы крови новый стационарный уровень свечения превышает первоначальный, что может быть объяснено прооксидантными свойствами альбумина. В случае слюны новый уровень свечения может оставаться постоянным, превышать исходный, а также быть существенно ниже. Показано, что кривые развития хемилюминесценции слюны могут быть использованы для оценки суммарного содержания антиоксидантов, а также для косвенной оценки уровня окислительного стресса. Однако, на данном этапе получены только качественные результаты, в связи с чем требуется продолжение исследований в выбранном направлении.

**Ключевые слова:** слюна, биохимический состав, хемилюминесценция, окислительный стресс.

Регулирование окислительно-восстановительного гомеостаза имеет решающее значение для поддержания нормального клеточного роста и обмена веществ. Окислительный стресс определяется как дисбаланс между образованием активных форм кислорода (АФК) и способностью клетки вызывать эффективный антиоксидантный ответ. При более низких концентрациях АФК являются важными сигнальными молекулами, участвующими в клеточной пролиферации, миграции и апоптозе [1]. Было идентифицировано несколько источников АФК в клетках и тканях, включая митохондриальную цепь переноса электронов и NADPH-оксидазы (NOX) [2]. При более высоких концентрациях большинство АФК вредны для клеток из-за накопления необратимых повреждений белков, липидов и, самое главное, ДНК, приводящей к мутациям и клеточной гибели [3].

АФК могут генерироваться либо экзогенными источниками, такими как ультрафиолетовое излучение, токсичные химические вещества и лекарства, физиологические изменения, либо внутриклеточными (эндогенными) источниками, такими как ферменты NOX на плазматической мембране, миелопероксидазы (МПО) в фагоцитах и как побочные продукты функции дыхательной цепи в митохондриях [4-7].

Система ингибирования избыточной генерации АФК состоит из неферментативного и ферментативного звеньев [8]. К специфическим антиоксидантным ферментам можно отнести супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионпероксидазу, глутатионредуктазу и трансферазы [9, 10]. Эта группа ферментов, локализующихся преимущественно внутриклеточно, обладает способностью разрушать свободные радикалы, а также участвовать в разложении гидроперекисей нерадикальным путем. Среди неферментных антиоксидантов можно выделить мочевую кислоту, аскорбат и альбумины, способные перехватывать избыточно продуцируемые свободные радикалы [11, 12].

Продукты антиоксидантной защиты традиционно определяют в плазме крови, однако существует возможность использования слюны в качестве субстрата [13-15]. Следует отметить, что исследование слюны имеет преимущества по сравнению с использованием венозной или капиллярной крови, что обусловлено неинвазивностью сбора и отсутствием риска инфицирования при получении биоматериала [16]. При этом слюна адекватно отражает биохимический статус и физиологическое состояние человека, что позволяет использовать ее в клинической лабораторной диагностике [17, 18].

Поскольку окислительный стресс является нарушением баланса между системой генерации АФК и системой антиоксидантной защиты, то при его оценке требуется количественное описание обеих составляющих. Для этих целей может быть успешно использован хемилюминесцентный метод анализа [19].

*Цель исследования* – определение потенциальной возможности использования метода кинетической хемилюминесценции для оценки уровня окислительного стресса в слюне.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

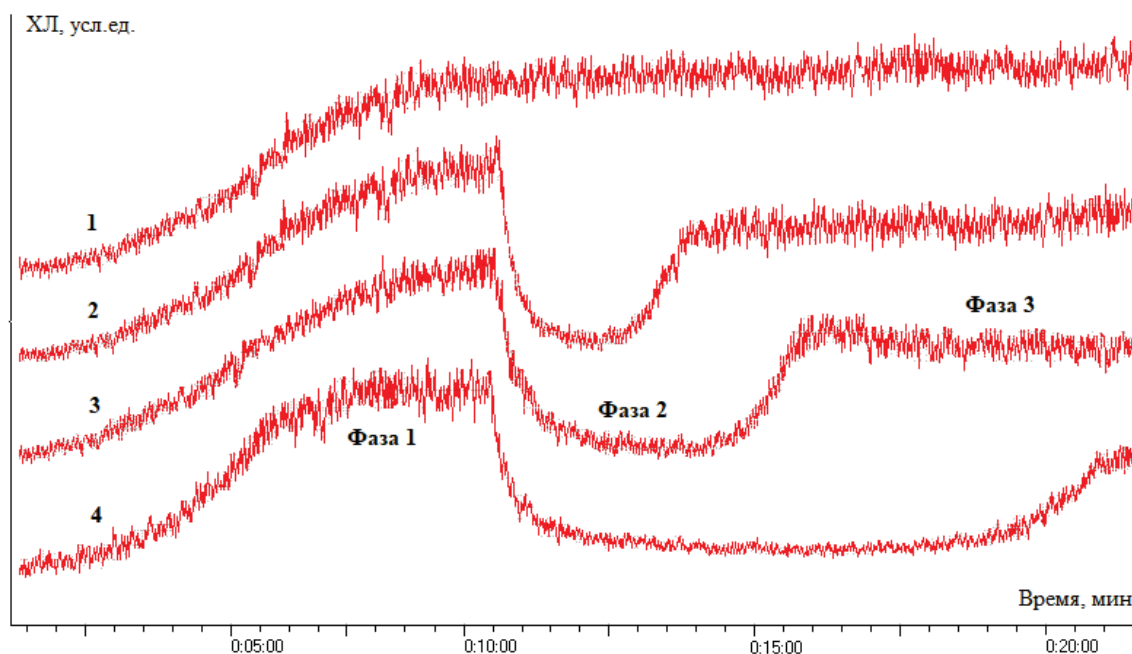
Измерения проводили на хемилюминометре «Lum-100» («ДИСофт», Россия) в термостатированных условиях при 37 °С. Для сопряжения компьютера и хемилюминометра использовали оригинальный программный продукт PowerGraph 3.3 (www.powergraph.ru). Для оценки антиоксидантной активности

использована методика люминол-активированной ХЛ [20] в модификации [21]. 50 мкл 0,05 М водного раствора АБАП (2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, «Fluka», Германия) и 20 мкл 0,1 мМ люминола (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, «Fluka», Германия) в 100 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) предварительно инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Реакцию терморазложения источника радикалов инициировали добавлением необходимого объема предварительно нагретого фосфатного буфера (37 °С). Основной особенностью модифицированной методики стал ввод в систему исследуемого образца после выхода аналитического сигнала на плато. В контрольном эксперименте регистрировали хемилюминесценцию системы, содержащей АБАП+люминол. Объем системы составлял 1,0 мл. Образцы слюны хранили при -20 °С, непосредственно перед исследованием разбавляли в дистиллированной воде. Конечное разбавление слюны от исходного составляло 1000 раз.

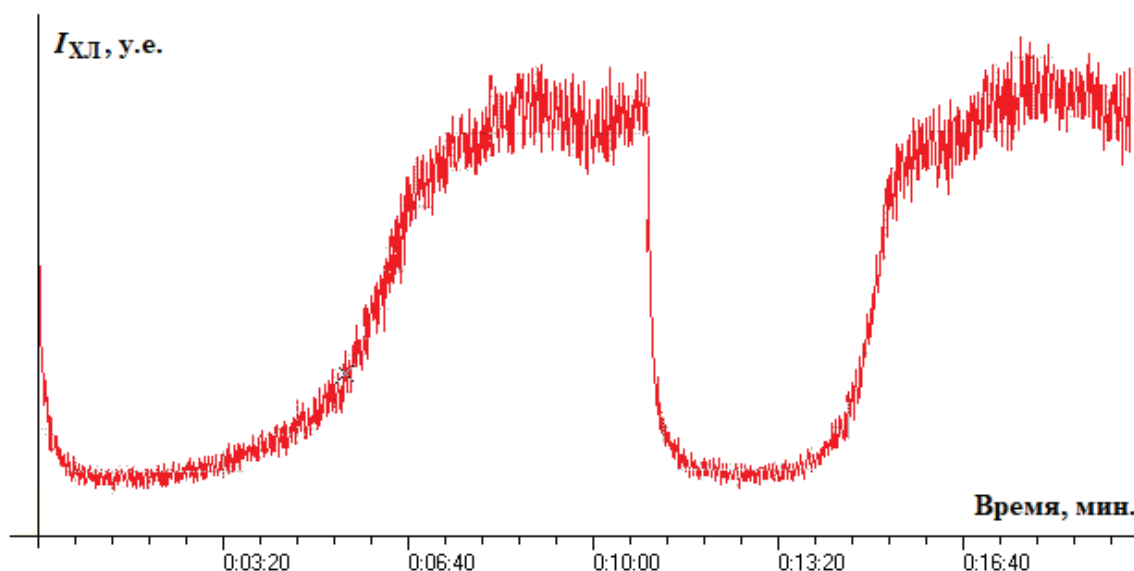
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принцип метода кинетической хемилюминесценции заключается в регистрации и обработке кривой развития хемилюминесценции во времени [12, 19, 21]. Типичная кривая развития хемилюминесценции в исследуемой системе приведена на рисунке 1. В качестве генератора свободных радикалов использовали органическое азосоединение АБАП, которое при нагревании до 37 °С распадается на два радикала. Показано, что в системе АБАП + люминол без добавления слюны (рис. 1, кривая 1) регистрируется свечение, которое достигает постоянного уровня в течение 10 мин. После добавления слюны интенсивность свечения снижается благодаря нейтрализации радикалов, образующихся при разложении АБАП, антиоксидантами слюны (рис. 1, кривая 2). При этом увеличение количества вводимой в систему слюны вызывает пропорциональное уменьшение свечения в исследуемой системе (рис. 1, кривые 2-4). После расходования антиоксидантов слюны свечение вновь нарастает и достигает нового стационарного уровня.

На кривой развития хемилюминесценции выделяется несколько участков (рис. 1). Разложение АБАП сопровождается нарастанием свечения до постоянного уровня, что соответствует фазе 1 (фаза АБАП). Уменьшение свечения за счет действия антиоксидантов, содержащихся в слюне, соответствует фазе 2. При этом площадь над «провалом» кривой хемилюминесценции может характеризовать суммарный вклад всех антиоксидантов в антиоксидантную активность слюны (рис. 2, 3). Было отмечено, что фаза 2 присутствует на всех кривых, однако ее площадь варьирует в достаточно широких пределах, что может быть обусловлено присутствием различных антиоксидантов и различиями в их концентрации. Так, среди неферментативного звена антиоксидантной защиты наибольший вклад вносят мочевая кислота и альбумины. На рисунке 2 приведена кривая, соответствующая образцу слюны с высоким содержанием мочевой кислоты (163,46 мкмоль/л), тогда как на рисунке 3 – с низким (23,08 мкмоль/л). Уровень альбумина в обоих образцах примерно одинаковый, уровень свечения в фазе 3 практически совпадает с первоначальным, т.е. происходит расходование всех антиоксидантов в образцах, тогда как генерации новых радикалов не наблюдается.

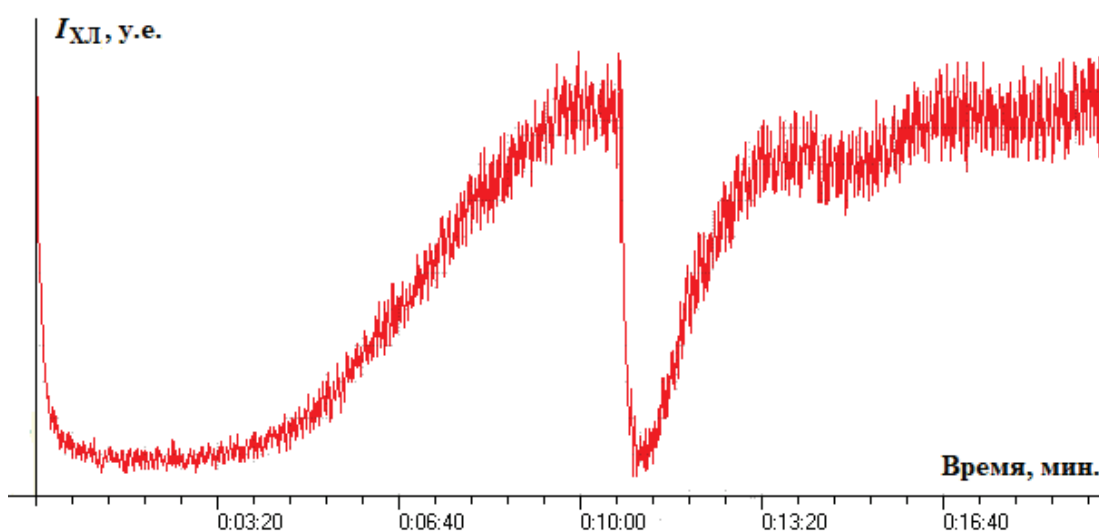


**Рисунок 1.** Кривая развития хемилюминесценции слюны (1 – АБАП + люминол; 2 – АБАП + люминол + слюна 1 мкл; 2 – АБАП + люминол + слюна 2 мкл; 2 – АБАП + люминол + слюна 5 мкл)

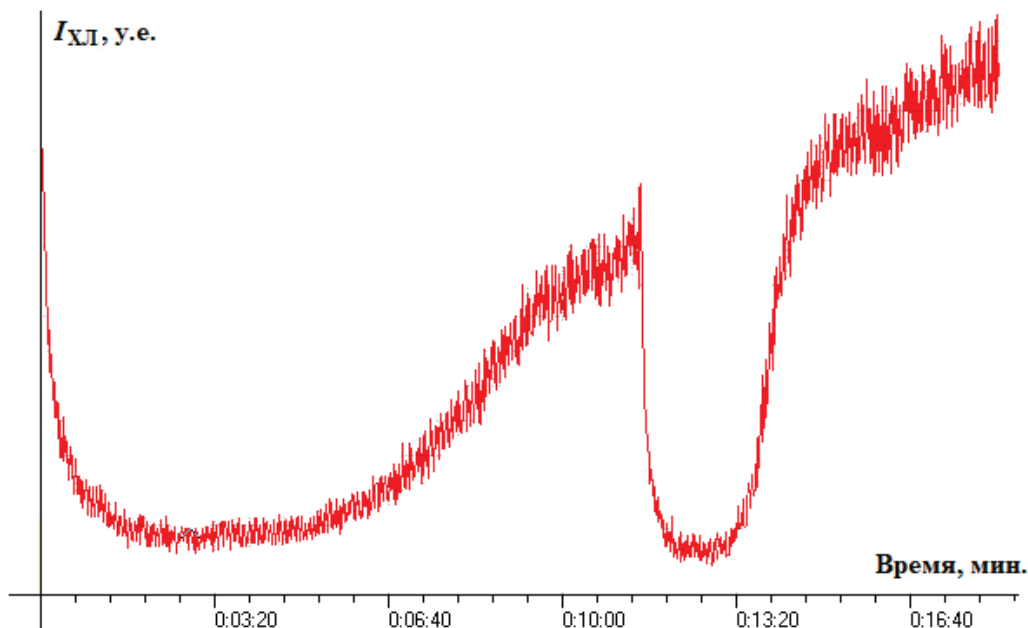


**Рисунок 2.** Пример кривой развития ХЛ (белок – 0,84 г/л, мочевая кислота – 163,46 мкмоль/л, альбумин – 0,417 ммоль/л, каталаза – 4,28 нкат/мл)

Отличительной особенностью развития кривых хемилюминесценции слюны по сравнению с плазмой крови является фаза 3. В случае плазмы крови новый стационарный уровень свечения превышает первоначальный, что может быть объяснено прооксидантными свойствами альбумина [12, 21]. В случае слюны новый уровень свечения может оставаться постоянным (рис. 2, 3), превышать исходный (рис. 4), а также быть существенно ниже (рис. 5). Характер кривой хемилюминесценции в фазе 3 также может быть связан с концентрацией альбумина в слюне, однако данное предположение нуждается в дополнительной проверке, поскольку содержание альбумина в слюне на порядок ниже, чем в плазме крови. Тем не менее в приведенных примерах на рисунке 4 содержание альбумина максимальное (0,591 ммоль/л), также в данном случае отмечен максимальный уровень белка, который может вносить вклад в изменение интенсивности хемилюминесценции. Сложнее объяснить случай, когда интенсивность свечения так и не возвращается к исходному стационарному уровню (рис. 5), что возможно, если в исследуемом образце присутствуют антиоксиданты, способные в течение длительного времени перехватывать радикалы АБАП (более часа в условиях эксперимента). Другое объяснение может быть связано с присутствием в слюне веществ, способных адсорбировать какой-либо компонент системы АБАП + люминол, тем самым снижая интенсивность хемилюминесценции, что также требует дополнительной проверки.



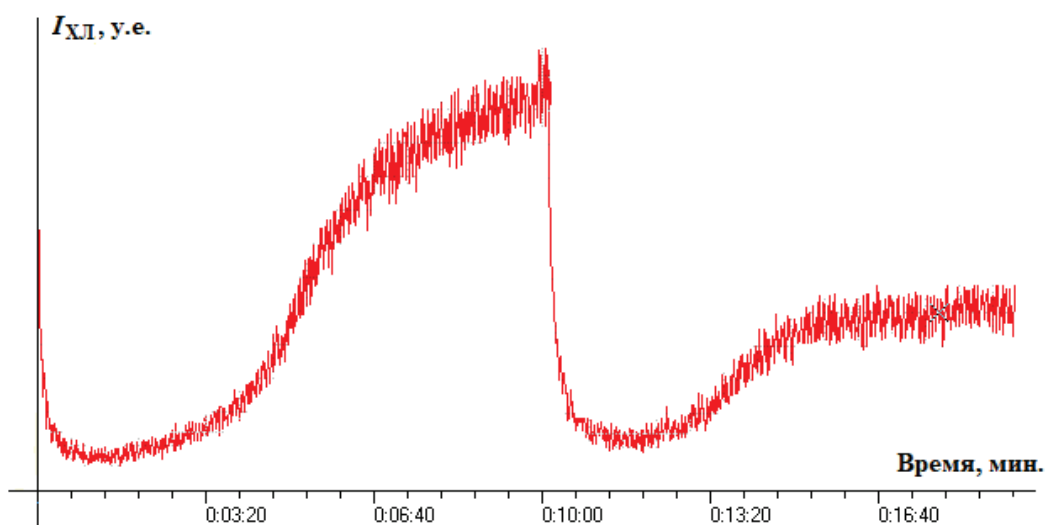
**Рисунок 3.** Пример кривой развития ХЛ (белок – 1,22 г/л, мочевая кислота – 23,08 мкмоль/л, альбумин – 0,452 ммоль/л, каталаза – 6,11 нкат/мл)



**Рисунок 4.** Пример кривой развития ХЛ (белок – 1,31 г/л, мочевиная кислота – 128,85 мкмоль/л, альбумин – 0,591 ммоль/л, каталаза – 9,35 нкат/мл)

Известно, что окислительный стресс можно характеризовать по уровню продуктов липопероксидации и эндогенной интоксикации в биологических жидкостях и тканях [22, 23]. Продукты перекисного окисления липидов подразделяют на первичные (диеновые конъюгаты), вторичные (триеновые конъюгаты и основания Шиффа) и конечные – малоновый диальдегид. Эндогенные токсины представляют собой вещества низкой и средней молекулярной массы (1500 до 5000 Д), в основном фрагменты эндогенных белков. Традиционно определяют две фракции МСМ при длинах волн 254 и 280 нм. Фракция МСМ 254 нм является интегральным показателем содержания УФ-поглощающих веществ, к которым, помимо продуктов протеолиза, относят небелковые вещества нормального и аномального метаболизма. Интенсивность УФ-поглощения слюны при 280 нм определяется главным образом наличием ароматических хромофоров и ее увеличение происходит вследствие накопления тирозин- и триптофан содержащих пептидов. Причиной этого может быть потеря белками ароматических аминокислот в результате окислительной модификации и фрагментации молекул. Более информативной является оценка коэффициента МСМ 280/254 нм. Рост данного показателя может свидетельствовать об усилении катаболических процессов, стимуляции процессов перекисного окисления липидов и иммуногенеза [24, 25].

В приведенных примерах кривых хемилюминесценции максимальное содержание продуктов перекисного окисления липидов отмечены для рисунка 5 (диеновые конъюгаты – 4,33 у.е., триеновые конъюгаты – 0,679 у.е., основания Шиффа – 0,413 у.е.), в этом же случае эндогенная интоксикация выражена в наименьшей степени



**Рисунок 5.** Пример кривой развития ХЛ (белок – 1,09 г/л, мочевиная кислота – 15,28 мкмоль/л, альбумин – 0,378 ммоль/л, каталаза – 3,60 нкат/мл)

(МСМ 280/254 – 0,872). Для примера на рисунке 4 отмечена обратная тенденция: уровень продуктов липопероксидации минимален (диеновые конъюгаты – 3,95 у.е., триеновые конъюгаты – 0,650 у.е., основания Шиффа – 0,372 у.е.), тогда как эндогенная интоксикация выражена в большей степени (МСМ 280/254 – 0,931). Можно предположить, что необходимость компенсировать высокий уровень продуктов липопероксидации активирует звено антиоксидантной защиты, однако на данном этапе исследования сложно сказать, какой именно компонент этого звена обуславливает наблюдаемый эффект уменьшения интенсивности хемилюминесценции.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено изучение слюны в норме методом кинетической хемилюминесценции. Показано, что кривые развития хемилюминесценции слюны могут быть использованы для оценки суммарного содержания антиоксидантов, а также для косвенной оценки уровня окислительного стресса. Однако, на данном этапе получены только качественные результаты, в связи с чем требуется продолжение исследований в выбранном направлении.

#### Список литературы / References:

1. Liou G-Y., Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.*, 2010, vol. 44 (5), pp. 479-496.
2. Bedard K., Krause K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, 2007, vol. 87 (1), pp. 245-313.
3. Schieber M., Chandel N. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.*, 2014, vol. 24 (10), pp. R453-462.
4. Liu Y., Fiskum G., Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.*, 2002, vol. 80 (5), pp. 780-787.
5. Robinson J.M. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem. Cell Biol.*, 2008, vol. 130 (2), pp. 281-297.
6. Richter K., Konzack A., Pihlajaniemi T., Heljasvaara R., Kietzmann T. Redox fibrosis: impact of TGFbeta1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biology*, 2015, vol. 6, pp. 344-352.
7. Morry J., Ngamcherdtrakul W., Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox Biology*, 2017, vol. 11, pp. 240-253.
8. Николаев И.В., Колобкова Л.Н., Ландесман Е.О., Степанова Е.В., Королева О.В. Антиоксидантная и пероксидазная активность слюны при воспалительных заболеваниях пародонта и возможность их коррекции. *Биомедицинская химия*, 2008, т. 54, № 4, с. 454-462. [Nikolayev I.V., Kolobkova L.N., Landesman Ye.O., Stepanova Ye.V., Koroleva O.V. Antioxidant and peroxidase activity of saliva in inflammatory periodontal diseases and the possibility of their correction. *Biomeditsinskaya khimiya*, 2008, vol. 54 (4), pp. 454-462. (In Russ.)]
9. Khan A., Tania M., Zhang D., Chen H. Antioxidant Enzymes and Cancer. *Chin. J. Cancer Res.*, 2010, vol. 22 (2), pp. 87-92.
10. Abiaka C., Al-Awadi F., Al-Sayer H., Gulshan S., Behbehani A., Farghally M. Activities of Erythrocyte Antioxidant Enzymes in Cancer Patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2002, vol. 16, pp. 167-171.
11. Чанчаева Е.А., Айзман Р.И., Герасев А.Д. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека. *Экология человека*, 2013, № 7, с. 550-558. [Chanchayeva Ye.A., Ayzman R.I., Gerasev A.D. Modern idea of the antioxidant system of the human body. *Ekologiya cheloveka*, 2013, vol. 7, pp. 550-558. (In Russ.)]
12. Созарукова М.М., Проскурина Е.В., Владимиров Ю.А. Сывороточный альбумин как источник и мишень свободных радикалов в патологии. *Вестник РГМУ*, 2016, № 1, с. 61-67. [Sozarukova M.M., Proskurina Ye.V., Vladimirov Yu.A. Serum albumin as a source and target of free radicals in pathology. *Vestnik RGMU*, 2016, vol. 1, pp. 61-67. (In Russ.)]
13. Östürk L.K., Akyüz S., Yarat A., Koç S., Gül N., Doğan B.N. Salivary lipid peroxidation and total sialic acid levels during healthy gestation and postpartum: a longitudinal study. *Clinical Biochemistry*, 2010, vol. 43, pp. 430-434.
14. Wong D.T. *Salivary Diagnostics*. Wiley-Blackwell, 2008, 320 p.
15. Giebutowicz J., Wroczynski P., Samolczyk-Wanyura D. Comparison of antioxidant enzymes activity and the concentration of uric acid in the saliva of patients with oral cavity cancer, odontogenic cysts and healthy subjects. *J. Oral Pathol. Med.*, 2011, vol. 40, pp. 726-730.
16. Miller C.S., Foley J.D., Bailey A.L., Campell C.L., Humphries R.L., Christodoulides N., Floriano P.N., Simmons G., Bhagwandin B., Jacobson J.W., Redding S.W., Ebersole J.L., McDevitt J.T. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.*, 2010, vol. 4 (1), pp. 171-189.
17. Soares Nunes L.A., Mussavira S., Bindhu O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia Medica*, 2015, vol. 25 (2), pp. 177-192.
18. Arunkumar S., Arunkumar J.S., Krishna N.B., Shakunthala G.K. Developments in diagnostic applications of saliva in oral and systemic diseases - A comprehensive review. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2014, vol. 3 (3), pp. 372-387.
19. Проскурина Е.В., Полимова А.М., Созарукова М.М., Прудникова М.А., Аметов А.С., Владимиров Ю.А. Кинетическая хемилюминесценция как метод оценки окислительного стресса при обследовании пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2016, т. 161, № 1, с.149-152. [Proskurina Ye.V., Polimova A.M., Sozarukova M.M., Prudnikova M.A., Ametov A.S., Vladimirov Yu.A. Kinetic

chemiluminescence as a method of assessing oxidative stress in the examination of patients with type 2 diabetes mellitus. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 2016, vol. 161 (1), pp. 149-152. (In Russ.)]

20. Yang X.F., Guo X.Q. Fe(II)-EDTA chelate-induced aromatic hydroxylation of terephthalate as a new method for the evaluation of hydroxyl radical-scavenging ability. *Analyst*, 2001, vol. 126 (6), pp. 928-932.

21. Созарукова М.М., Полимова А.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Изменения в кинетике хемилуминесценции плазмы как мера системного окислительного стресса в организме человека. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 2, с. 337-344. [Sozarukova M.M., Polimova A.M., Proskurina Ye.V., Vladimirov Yu.A. Changes in the kinetics of plasma chemiluminescence as a measure of the oxidative oxidative structure in human organism. *Biofizika*, 2016, vol. 61 (2), pp. 337-344. (In Russ.)]

22. Choudhari S.K., Chaudhary M., Gadbail A.R., Sharma A., Tekade S. Oxidative and antioxidative mechanism in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncology*, 2014, vol. 50 (1), pp. 10-18.

23. Park H.S., Kim S.R., Lee Y.C. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*, 2009, vol. 14 (1), pp. 27-38.

24. Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., Понукалина Е.В., Агабеков А.И. Закономерности изменений процессов свободно радикальной дестабилизации биологических мембран при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки, их роль в развитии опухолевой прогрессии. *Фундаментальные исследования*, 2015, № 1, с. 164-168. [Chesnokova N.P., Barsukov V.YU., Ponukalina Ye.V., Agabekov A.I. Regularities of changes in the processes of free radical destabilization of biological membranes in adenocarcinoma of the ascending colon, their role in the development of tumor progression. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2015, vol. 1, pp. 164-168. (In Russ.)]

25. Панкова О.В., Перельмутер В.М., Савенкова О.В. Характеристика экспрессии маркеров пролиферации и регуляции апоптоза в зависимости от характера дисрегуляторных изменений в эпителии бронхов при плоскоклеточном раке легкого. *Сибирский онкологический журнал*, 2010, т. 41, № 5, с. 36-41. [Pankova O.V., Perel'muter V.M., Savenkova O.V. Characterization of expression of proliferation markers and regulation of apoptosis, depending on the nature of dysregulator changes in bronchial epithelium in squamous cell lung cancer. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*, 2010, vol. 41 (5), pp. 36-41. (In Russ.)]

#### EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS LEVEL TO CHANGE THE KINETICS OF SALIVA CHEMILUMINESCENCE

Bel'skaya L.V., Sarf E.A.

Omsk State Pedagogical University

*Naberezhnaya Tukhachevskogo St., 14, Omsk, 644043, Russia; e-mail: Ludab2005@mail.ru*

**Abstract.** Oxidative stress is a violation of the balance between the active oxygen generation system and the antioxidant defense unit, and a quantitative description of both components is required when evaluating it. The purpose of the study was to determine the potential use of the kinetic chemiluminescence method to assess the level of oxidative stress in saliva. It is shown that with an increase in the amount of saliva introduced into the system, a proportional decrease in the luminescence in the ABAP + luminol system is observed. A distinctive feature of the development of salivary chemiluminescence curves in comparison with blood plasma is the site after the expenditure of all antioxidants. In the case of blood plasma, the new steady-state luminescence level exceeds the initial level, which can be explained by the prooxidant properties of albumin. In the case of saliva, a new level of luminescence can remain constant, exceed the original level, and also be significantly lower. It is shown that the curves for the development of saliva chemiluminescence can be used to estimate the total content of antioxidants, as well as for an indirect assessment of the level of oxidative stress. However, at this stage only qualitative results are obtained, in connection with which further research is required in the chosen direction.

**Key words:** saliva, biochemical composition, chemiluminescence, oxidative stress.