

УДК 599.323.572

БИОХИМИЯ

ПРОСТОЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНОЙ АНТИОКСИДАНТОЙ АКТИВНОСТИ СЛЮНЫ И МОЧИ ЧЕЛОВЕКА

Симонян Р. М., Алексанян А. С., Симонян Г. М., Бабаян М. А.,
Оксузян Г. Р., Фесчян С. М., Алексанян С. С., Симонян М. А.

С использованием процесса обесцвечивания кумасии бриллианта синего определенной стационарной концентрации O_2^- , продуцированной при расщеплении перекиси водорода NH_4OH , определили суммарную удельную антиоксидантную активность слюны ($55,6 \pm 6,3$ ед./мл, $p < 0,05$, $n=6$) и мочи ($125 \pm 9,2$ ед./мл, $p < 0,05$, $n=6$) здорового человека. Диапазон изменений этих активностей может быть использован в эксперименте и в клинической практике как новый, простой, доступный и чувствительный диагностический тест заболеваний и эффективности их терапии.

Ключевые слова: моча, слюна, суммарная антиоксидантная активность.

Введение. Суммарная антиоксидантная активность слюны человека состоит из активности мочевой кислоты, альбумина и аскорбиновой кислоты. Эта активность снижается при заболевании зубов и десен, с определенным фоном оксидативного повреждения [1,2]. Антиоксидантная активность мочи в основном обусловлена присутствием мочевой кислоты [3]. Определение суммарной антиоксидантной активности слюны, а также мочи человека различными, сравнительно сложными методами является маркером различного характера заболеваний [4-9].

Целью работы являлось определение суммарной антиоксидантной активности слюны и мочи человека, с использованием простого, чувствительного и доступного лицензированного способа, с

непосредственным использованием продуцированных супероксидных радикалов при расщеплении перекиси водорода аммиаком [10, 11].

Материал и методы

Для продуцирования супероксидных радикалов (O_2^-) использован раствор перекиси водорода (0,05 М) и NH_4OH (0,01 М). Для количественного определения стационарной концентрации O_2^- использован краситель кумасии бриллианта синего (КБС) фирмы «Sigma». Для дисмутации продуцированных супероксидов использованы Cu,Zn -СОД, выделенные и очищенные из печени быка [12].

Определение стационарной концентрации O_2^- , образованной при расщеплении перекиси водорода аммиаком.

После смешивания растворов перекиси водорода и аммиака в приведенных концентрациях (1:1 об/об), нагревания до кипячения в течение минуты и охлаждения водой до комнатной температуры, стационарную концентрацию полученных O_2^- определяли эквивалентным обесцвечиванием КБС этими радикалами (молярное поглощение КБС при 580 нм равно $43000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Процедура определения антиоксидантной активности слюны и мочи человека.

К 5 мл раствора КБС ($C_0=4,6 \times 10^{-4} \text{ M}$ с $A_{580}=2,0$) добавляли по 0,1; 0,2; 0,3 и 0,4 мл слюны здорового человека и 0,2 мл раствора O_2^- ($3,5 \times 10^{-4} \text{ M}$). Далее определяли проценты обесцвечивания КБС (снижение плотности максимального оптического поглощения при 580 нм) под влиянием только O_2^- и O_2^- , в присутствии слюны или мочи человека в приведенных концентрациях при комнатной температуре в течение 25-30 мин. За единицу суммарной антиоксидантной активности слюны или мочи человека принимали то количество O_2^- , которое вызывает 50%-ное обесцвечивание КБС. Удельная антиоксидантная активность была выражена в ед./мл слюны или мочи.

Оптические спектры поглощения были зарегистрированы на спектрофотометре “Specord UV/VIS”, Германия, с длиной оптического пробега в 1 см.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента Фишера, с определением критерия достоверности “p” ($M \pm m$), числа опытов -6 ($n=6$).

Результаты и обсуждение

При расщеплении перекиси водорода аммиаком (NH_4OH) в приведенных условиях образуется O_2^- , которое и обесцвечивает КБС. Действительно, Cu,Zn-SOD ($3 \times 10^{-8}\text{M}$) подавляет такое обесцвечивание КБС..

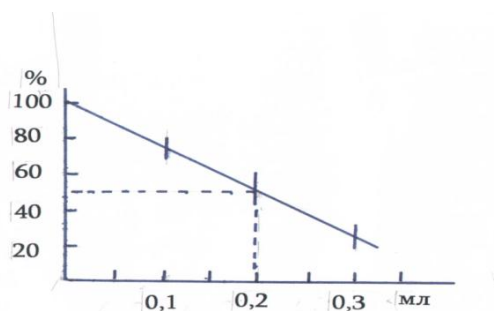


Рис.1. Проценты подавления обесцвечивания КБС при 580 нм различными количествами слюны под влиянием O_2^- , при расщеплении перекиси водорода аммиаком в течение 25-30 мин. при комнатной температуре ($p < 0,05$, $n = 6$).

Как показано на рис.1, 0,2 мл слюны человека обладает 1 ед. антиоксидантной активности. На этом основании расчеты показывают, что удельная антиоксидантная активность слюны составляет $55,6 \pm 6,3$ ед./мл, ($p < 0,05$, $n = 6$).

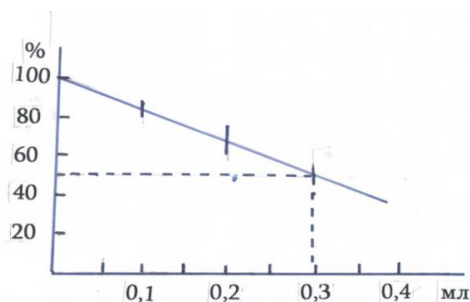


Рис.2. Проценты подавления обесцвечивания КБС при 580 нм различными количествами мочи человека под влиянием O_2^- , при расщеплении перекиси водорода аммиаком в течение 25-30 мин при комнатной температуре ($p < 0,05$, $n = 6$).

Аналогичным образом, на основании полученных данных на рис.2, удельная антиоксидантная активность мочи человека составляет $125 \pm 9,2$

ед./мл, ($p < 0,05$, $n=6$). Фактически суммарная удельная антиоксидантная активность мочи человека в 2,24 раз больше такой активности слюны. Возможно, это связано с повышенным содержанием в моче мочевой кислоты. Время определения удельной антиоксидантной активности слюны или мочи человека составляет всего 1-1,5 часа. При этом не требуется сложных и труднодоступных оборудований и химикатов. Это в свою очередь увеличивает перспективы использования данного метода в клинической практике.

Таким образом, с использованием продуцированных O_2^- при расщеплении перекиси водорода гидроокисью аммония разработан метод определения суммарной удельной антиоксидантной активности слюны и мочи человека. Диапазон изменения этих активностей может быть использован как простой и чувствительный маркер диагностики и эффективности терапии заболеваний.

**ՄԱՐԴՈՒ ԹՔԻ ԵՎ ՄԵԶԻ ԳՈՒՄԱՐԱՅԻՆ ՀԱՎԱՕՔՍԻԴԱՆՏԱՅԻՆ
ԱՎՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ՊԱՐԶ ՄԵԹՈԴ**

**Միմոնյան Ռ. Մ., Ալեքսանյան Ա. Ս., Միմոնյան Գ. Մ., Բաբայան Մ. Ա.,
Օքսուզյան Գ. Ռ., Ֆեսչյան Ս. Մ., Ալեքսանյան Ս. Ս., Միմոնյան Մ. Ա.**

Օգտագործելով NH_4OH -ով ջրածնի պերօքսիդի ճեղքման գործընթացում գոյացած որոշակի ստացիոնար քանակի O_2^- -երով կումասի բրիլիանտ կապույտի գունաթափման գործընթացը՝ որոշվել է առողջ մարդու թքի (55.6 ± 6.3 միավոր/մլ, $p < 0.05$, $n=6$) և մեզի (125 ± 9.2 միավոր/մլ, $p < 0.05$, $n=6$) գումարային տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվությունը:

Այդ ակտիվությունների փոփոխման սահմանները կարելի է օգտագործել էքպերիմենտում և կլինիկական պրակտիկայում որպես հիվանդությունների և դրանց բուժման արդյունավետության նոր, զգայուն, հասարակ ու ձեռնմխելի ախտորոշիչ թեստ:

Բանալի բառեր. մեզ, թուք, հակաօքսիդանտային ակտիվություն:

**THE SIMPLE METHOD OF DEFINING THE SUMMARY OXIDANT
ACTIVITY IN HUMAN SALIVA AND URINE**

**Simonyan R. M., Alexanyan A. S., Simonyan G. M., Babayan M. A.,
Oksuzyan G. R., Feschyan S. M., Alexanyan S. S., Simonyan M. A.**

Using the process of the bleaching of comassie brilliant blue by determined stationary concentration of O_2^- , produced during the decay of

hydrogen peroxide with NH₄OH, the total specific antioxidant activity of saliva (55.6±6.3 unit/ml, p<0.05, n=6) and urine (125±9.2 unit/ml, p<0.05, n=6) of the healthy people are determined. The range of the changes of these activities as a new, simple, available and sensitive diagnostic test of the diseases and effectiveness its therapy can be used in experiment and clinical practice.

Keywords: saliva, urine, antioxidant activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moore S., Calder K. A., Miller N. J., Rice-Evans C. A. Antioxidant Activity of Saliva and Periodontal Disease.// *Free Radic Res.* 1994. 21(6): 417-425.
2. Randa Diab-Ladki, Bernard Pellat, Ramez Chahine. Decrease in the Total Antioxidant Activity of Saliva in Patients with Periodontal Disease. Article July 2003 with 80 Reads. DOI: 10.1007/s00784-003-0208-5.
3. Facchini F., Chen I., Clarie B. Hollenbeck. Relationship between Resistance to Insulin-Mediated Glucose Uptake, Urinary Uric Acid Clearance and Plasma Uric Acid Concentration. // *JAMA.* 199. 266(21). P. 3008-3011.
4. Azizi A., Sarlati F., Parchakani A., Alirezaei S. Evaluation of Whole Saliva Antioxidant Capacity in Patients with Periodontal Diseases. // *OJST.* 2014. 4. P. 228-231.
5. Pendyala G., Thomas B. and Saurabh R Joshi Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in Type 2 Diabetic Patients with and without Periodontal Disease: A Case-Control Study.// *NAm J Med Sci.* 2013. 5(1). P. 51–57.
6. Gupta N., Narinder Dev Gupta, Gupta A. , Goyal L., Garg S. The Influence of Type 2 Diabetes Mellitus on Salivary Matrix Metalloproteinase-8 Levels and Periodontal Parameters: a Study in an Indian Population.// *Eur J Dent.* 2015. 9(3). P. 319–323.
7. Baliga S., Chaudhary M., Bhat S. S., Bhatiya P., Thosar N., Bhansali P. Determination of Toral Antioxidant Capacity of Saliva in Sickle Cell Anemic Patients - A Cross-Sectional Study.// *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2017. 35(1). P14-18.
8. Peluso I., Raguzzini A. Salivary and Urinary Total Antioxidant Capacity as Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Patholog Res Int.* 2016. 5480267. Published online 2016 Feb 7. doi: [10.1155/2016/5480267](https://doi.org/10.1155/2016/5480267)

9. Rumley A. G., Paterson J. R. Analytical Aspects of Antioxidants and Free Radical Activity in Clinical Biochemistry. // Review Article Ann Clin Biochem 1998. 35. P. 181-200.
10. Միմոնյան Ռ. Մ., Միմոնյան Գ. Մ., Միմոնյան Մ. Ա., Կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների սուպերօքսիդիդիսմուտազային ակտիվության որոշման եղանակ, Գյուտի արտոնագիր N 2929, 2015 թ., ՀՀ Մտավոր սեփականության գործակալություն:
11. Симонян Р. М., Бабаян М. А., Оксюзян Г. Р. Симнян Г. М., Фесчян С. М., Енгибарян А. А., Симонян М. А. Матевосян Р. Ш. Образование супероксидных и гидроксильных радикалов при расщеплении перекиси водорода гидроксидом аммония.// Биол.ж Армении. 2017. LXIX. 2. P.53-58.
12. Симонян М. А. Способ получения супероксиддисмутазы из животного сырья.// Открытия, Изобретения (СССР). 1988. N28. С. 107. АС 1413139.

Сведения об авторах

Симонян Р. М. - Кандидат биологических наук, доцент
Институт Биохимии им. Г. Х. Бунатяна НАН РА
Эл. почта: ruzanSimonyan@gmail.com

Алексян А. С. - Кандидат биологических наук, доцент
Ширакский государственный университет
Эл. почта: aleqsanyan83@mail.ru

Симонян Г. М. - Кандидат биологических наук
Институт Биохимии им. Г. Х. Бунатяна НАН РА,
Эл. почта: gegasim@mail.ru.

Бабаян М. А. - Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Институт Биохимии им. Г. Х. Бунатяна НАН РА
Эл. почта: madlenababayan@gmail.com

Оксюзян Г. Р. - Кандидат биологических наук, доцент
Ширакский государственный университет
Эл. почта: gayane.oxsuzyan@mail.ru

Фесчян С. М. - Кандидат биологических наук,
Ереванский Государственный Медицинский Университет им. М. Гераци
Эл. почта: feschyan.sona@mail.ru

Алексян С. С. - Доктор биологических наук, профессор
Ширакский государственный университет
Эл. почта: saleqsanyan55@yandex.ru

Симонян М. А. - Доктор биологических наук, профессор
Институт Биохимии им. Г. Х. Бунатяна НАН РА
Эл. почта: maximSimonyan@gmail.com.

Поступило в редакцию 30.04.2019