

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ С ПОМОЩЬЮ ПЛАТИНОВОГО НАНОЭЛЕКТРОДА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

А. Н. Ванеев¹✉, А. В. Алова¹, А. С. Ерофеев^{1,2}, П. В. Горелкин³, А. Д. Алексахин¹, О. В. Безнос⁴, Н. Б. Чеснокова⁴, О. А. Кост¹, А. Г. Мажуга^{1,2,5}, Ю. Е. Корчев^{6,7}, Н. Л. Клячко¹

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

² Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Москва

³ ООО «Медицинские нанотехнологии», Москва

⁴ Научно-исследовательский институт глазных болезней, Москва

⁵ Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва

⁶ Департамент медицины, Имперский колледж Лондона, Лондон

⁷ Институт наноиндустрии WPI (WPI-NanoLSI), Университет Канадзава, Канадзава

Активные формы кислорода (АФК) являются жизненно необходимыми метаболитами в многочисленных биологических функциях. Нарушение клеточных механизмов может привести к перепроизводству АФК и вызвать окислительное повреждение ДНК, белков, клеток и тканей, которое связано с патогенезом ряда нейродегенеративных и воспалительных заболеваний. Понимание взаимосвязи между уровнем АФК и этими нарушениями важно при разработке методов лечения для борьбы с окислительным стрессом. Целью работы было использование разработанного нами метода определения АФК в биологических жидкостях, а именно в слезе и внутриглазной жидкости, с помощью стабильного платинового нанoeлектрода, позволяющего оценивать уровень пероксида водорода (H_2O_2) вплоть до 1 мкМ, а также изучение динамики изменения уровня H_2O_2 при антиоксидантной терапии. Показано влияние наночастиц супероксиддисмутазы (СОД) на уровень АФК в биологических жидкостях. После закапывания наночастиц СОД происходило увеличение уровня H_2O_2 в слезе через 10 и 30 мин. В случае с внутриглазной жидкостью рост концентрации H_2O_2 начинается только спустя 30 мин после закапывания, что свидетельствует о постепенном проникновении наночастиц во внутренние структуры глаза. Использование метода представляется эффективным для диагностики и контроля лечения глазных заболеваний.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, платиновый нанoeлектрод, активные формы кислорода, наносенсор, наночастицы супероксиддисмутазы, окислительный стресс

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Соглашения №14.575.21.0147 (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57517X0147).

✉ **Для корреспонденции:** Александр Николаевич Ванеев
Ленинские горы, д. 1, стр. 11Б, г. Москва, 119991; vaneev.aleksandr@gmail.com

Статья получена: 28.06.2018 **Статья принята к печати:** 25.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.045

DETECTING REACTIVE OXYGEN SPECIES IN BIOLOGICAL FLUIDS BY PLATINUM NANO-ELECTRODE APPLYING AMPEROMETRIC METHOD

Vaneev AN¹✉, Alova AV¹, Erofeev AS^{1,2}, Gorelkin PV³, Aleksashkin AD¹, Beznos OV⁴, Chesnokova NB⁴, Kost OA¹, Majouga AM^{1,2,5}, Korchev Y^{6,7}, Klyachko NL¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² National University of Science and Technology «MISIS», Moscow, Russia

³ Medical Nanotechnology LLC, Moscow, Russia

⁴ Helmholtz Institute of Ophthalmology, Moscow, Russia

⁵ Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

⁶ Department of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom

⁷ WPI Nano Life Science Institute (WPI-NanoLSI), Kanazawa University, Kanazawa, Japan

Reactive oxygen species (ROS) are vital metabolites in numerous biological functions. Disorders of cellular mechanisms can cause overproduction of ROS and, subsequently, oxidative damage to DNA, proteins, cells and tissues, which is associated with the pathogenesis of a number of neurodegenerative and inflammatory diseases. Development of highly sensitive, relatively simple and fast-to-implement innovative methods to detect oxidative stress requires understanding of how such disorders relate to the level of ROS. This research aimed to apply the biological fluids' ROS detection method we have developed (using the stable platinum nanoelectrode that allows assessing the level of hydrogen peroxide (H_2O_2) down to 1 μ M) and determine the level of H_2O_2 in lacrimal and intraocular fluids of rabbits, as well as to investigate how the level of H_2O_2 changes under the influence of antioxidant therapy. The effect superoxide dismutase (SOD) nanoparticles produce on biological fluids' ROS level was shown. The level of H_2O_2 in lacrimal fluid increased 10 and 30 min after instillation of SOD nanoparticles. As for the intraocular fluid, H_2O_2 concentration starts to grow only 30 min after instillation of SOD nanoparticles, which suggests that they penetrate the internal structures of the eye gradually. The method seems to be of value in the context of eye diseases diagnosing and treatment.

Keywords: antioxidant activity, platinum nanoelectrode, reactive oxygen species, nanosensor, superoxide dismutase nanoparticles, oxidative stress

Funding: the study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation in the context of the Agreement #14.575.21.0147 (project code RFMEFI57517X0147).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander N. Vaneev
Leninskie Gory 1, bl. 11B, Moscow, 119991; vaneev.aleksandr@gmail.com

Received: 28.06.2018 **Accepted:** 25.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.045

Окислительный стресс в тканях сопровождается чрезмерным образованием активных форм кислорода (АФК) и истощением эндогенных запасов антиоксидантов [1]. В ходе эндогенных метаболических реакций аэробные клетки продуцируют АФК, такие как супероксид-анион (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($\text{OH}^\bullet$) [2]. Одним из наиболее уязвимых мест в организме являются органы зрения [3]. Ткани глаза достаточно долго находятся под действием света, что приводит к постоянному фотоинициированию радикальных процессов, ведущих к повреждению клеток, к перекисному окислению липидов мембран, к окислительной модификации белков, окислительному повреждению ДНК [4]. С окислительным стрессом связано много глазных патологий: катаракта [5], увеит [6], ретинопатия [7], воспаление роговицы [8]. Все АФК являются окислителями клеточных компонентов и по большей части приводят к необратимым повреждениям клеток. Концентрация АФК в организме контролируется антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутазой (СОД), каталазой) и низкомолекулярными антиоксидантами (витаминами А, С, Е, и т. д.) [9].

Получение информации об антиоксидантном профиле слезной и внутриглазной жидкостей, таким образом, представляется важной задачей. Основная проблема современных методов измерения уровня АФК в слезной жидкости в том, что они низкочувствительны, а измерение уровня АФК в большинстве случаев производится непрямыми методами [10]. Существуют также ограничения при необходимости получения объема слезной жидкости у лабораторных животных, поэтому большинство аналитических методов не подходит для решения данной проблемы [11, 12].

Таким образом, для изучения антиоксидантной составляющей слезной и внутриглазной жидкостей необходимы специальные высокоэффективные чувствительные методы, позволяющие определять уровень АФК в небольших объемах и в достаточно малых концентрациях, что важно для диагностики и профилактики глазных заболеваний [13].

Для определения антиоксидантной активности слезной жидкости чаще используют хемотропные флуоресцентные и спектрофотометрические методы [14, 15], в которых с помощью модельных систем можно генерировать АФК и по ингибированию или торможению модельных реакций спектрофотометрически оценивать антиоксидантный уровень в образце. Недостатком таких систем, во-первых, является рН среды, отличающийся от физиологических условий, во-вторых, большинство методов измерения уровня АФК не прямые, что накладывает ряд ограничений и снижает достоверность полученных данных.

Активация свободнорадикальных процессов служит одной из причин новообразования сосудов при воспалительных процессах. Окислительный стресс, таким образом, является важным звеном в патогенезе воспалительных процессов. Основными причинами развития воспаления могут быть инфекции, системные аутоиммунные заболевания, травматические повреждения глаз, ожоги, гормональный дисбаланс и нарушение метаболизма [16, 17]. Так, воспаление сосудистой оболочки глаза, или увеит, часто затрагивает и другие структуры этого органа, приводя к различным проблемам со зрением [18]. Пусковым механизмом для развития нарушения является сенсибилизация тканей глаза инфекционным или иным антигеном с дальнейшим проникновением нейтрофилов к очагу патологического процесса. Нейтрофилы уничтожают микроорганизмы, вырабатывая АФК за счет НАДФН-

оксидазы. В условиях воспаления, независимо от этиологии заболевания, основными источниками АФК помимо нейтрофилов являются и макрофаги [19]. Поэтому для лечения воспалительных процессов наряду с противовоспалительными препаратами целесообразно применение антиоксидантов. Основная роль в развитии осложнений при воспалительных глазных процессах принадлежит активации реакций свободнорадикального окисления и накоплению АФК [3].

Перспективным подходом в данном случае представляется использование наночастиц в качестве систем доставки, так как они способны значительно увеличивать биодоступность лекарственного препарата [20]. Так, наночастицы СОД на основе блок-иономерных комплексов нетоксичны, неиммуногенны и биосовместимы. Антиоксидантные ферменты обладают наибольшей эффективностью по сравнению с низкомолекулярными антиоксидантами в связи с повторной многократной реакцией с субстратом. Основное преимущество наночастиц СОД в том, что они обладают большим временем циркуляции в тканях глаза по сравнению с нативным ферментом. В экспериментах *in vivo* было показано, что наночастицы СОД весьма эффективны при лечении иммуногенного увеита и химического ожога глаза [21].

Целью данной работы было определение АФК в слезной и внутриглазной жидкостях кроликов амперометрическим методом с использованием платинового нанозэлектрода, а также исследование влияния наночастиц СОД на динамику концентрации АФК в слезной и внутриглазной жидкостях интактных кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наночастицы СОД получали по методике, описанной в работе [22]. Суть методики заключается в самопроизвольной послойной самосборке противоположно заряженных полиионов, приводящей к стехиометрическим комплексам со 100%-й эффективностью загрузки. Для этого к раствору СОД в 0,01 М фосфатном буфере PBS (рН = 7,4) (Ферментные технологии; Россия), преимущественно отрицательно заряженной в физиологических условиях, добавляли протамин (Sigma; США), положительно заряженный при рН = 7,4, далее добавляли отрицательно заряженный блок-сополимер полиэтиленгликоля и поли-L-глутаминовой кислоты (Alamanda Polymers; США), с последующей сшивкой с помощью глутарового альдегида (Sigma; США).

Объектами исследования были образцы слезной и внутриглазной жидкостей кроликов, предоставленные сотрудниками Института глазных болезней им. Гельмгольца. В эксперименте было задействовано 25 кроликов породы шиншилла массой 2,0–2,5 кг. Содержание и уход соответствовали «Санитарным правилам по содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным МЗ СССР 6 июля 1973 г. и приказа МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г. Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с СОП лаборатории. Животных содержали при 18–26 °С в комнатах с 12-часовым циклом освещения, относительной влажностью 30–70%, 100% вентилированием без рециркуляции со сменой воздуха 7–12 объемов комнаты в час, по одному в клетках, укомплектованных поилками и кормушками. Кролики получали «Комбикорм гранулированный для кроликов универсальный» (Провими-Волосово; Ленинградская обл.).

Лабораторные животные до начала исследования содержались 14 дней для адаптации. Во время этого периода у животных контролировали признаки отклонения от нормального состояния здоровья. Перед формированием групп проводился подробный осмотр. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер. В экспериментальные группы случайным образом были отобраны животные без внешних отклонений.

В данном исследовании в качестве тест-системы использовали кроликов линии серая шиншилла. Ее представителей наиболее часто используют для фармакологических исследований действия лекарственных веществ на ткани глаза.

Выбор данного вида лабораторных животных обусловлен крупным размером глаз, обеспечивающим удобство оценки клинических проявлений заболевания, и возможностью отбора достаточного количества влаги передней камеры глаза.

Работа с экспериментальными животными проведена в соответствии с приказом министерства Здравоохранения № 755 от 12 августа 1977 г. и положениями Хельсинской декларации. Все процедуры с животными одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ МНИИ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России.

Всем кроликам одновременно закапывали по 30 мкл раствора наночастиц (2 мг/мл) в один глаз, другой глаз — контроль. Далее с промежутками 10, 30, 60, 120 мин отбирали слезную и внутриглазную жидкости.

Образцы слезной жидкости были получены с помощью нескольких кружков фильтровальной бумаги диаметром 5 мм. Кружки помещали в нижний свод конъюнктивного мешка на 5 мин, затем вынимали и помещали в 300 мкл раствора PBS на 20 мин. Элюат центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об./мин на центрифуге (Labsystems; Финляндия) и надосадочную жидкость использовали непосредственно для измерений.

Забор внутриглазной жидкости осуществляли путем прокола роговицы в районе лимба (парацентез). После осуществления забора животному проводили эвтаназию с помощью воздушной эмболии.

Определение уровня АФК осуществляли амперометрическим методом. Для этого в образцах биологических жидкостей использовали углеродные нанoelectроды, покрытые платиной, и хлорсеребряный электрод сравнения.

Регистрацию разности потенциалов между платиновым микроэлектродом и электродом сравнения осуществляли patch-clamp усилителем Model 2400 (A-M Systems; США). Передачу и запись измерений на компьютер проводили с помощью АЦП-ЦАП преобразователя USB-6211 (National Instruments; США) и программы WinWCP. Для подведения наносенсора использовали микроманипулятор PatchStar (Scientifica; Великобритания). Все манипуляции проводили на столике инвертированного микроскопа (Nikon; Япония).

Концентрацию АФК, а именно концентрацию H_2O_2 , оценивали при потенциале +800 мВ относительно хлорсеребряного электрода [23]. При данных условиях протекает реакция $2H_2O_2 \leftrightarrow 2H_2O + O_2$, которая катализируется платиной; поскольку супероксид-радикал довольно быстро превращается в растворе в пероксид водорода, то суммарная концентрация H_2O_2 определяет общий фон окислительных процессов [24]. Уровень кислорода оценивали при потенциале -800 мВ.

Для изготовления платиновых электродов использовали кварцевые заготовки с внутренним и внешним диаметрами

0,9 мм и 1,2 мм соответственно (рис. 1). Заготовки вытягивали на лазерном пуллере (Sutter; США), в результате чего получали два нанокapилляра с диаметром отверстия 100–500 нм. На полученные нанокapилляры осаждали пиролитический углерод посредством термического разложения бутана в бескислородной среде.

Нанокapилляр заполняли бутаном через резиновую трубку, плотно прилегающую к широкому концу кварцевого нанокapилляра. Затем острый конец нанокapилляра вводили в аналогичную кварцевую заготовку соответствующего размера. Через эту заготовку осуществляли подачу ламинарного потока аргона. Далее поступательным движением от острого конца нанокapилляра производили термическую обработку с помощью бутан-пропановой горелки на расстоянии 1 см в течение 15 с.

Мы использовали электрохимический метод создания полостей в углеродных нанoelectродах с последующим осаждением платины [25–27]. В растворе, содержащем 0,1 мМ NaOH и 10 мМ KCl, осуществляли травление электрода. Нанoelectрод и электрод сравнения погружали в раствор; на электрод сравнения подавали переменное напряжение симметричной V-образной формы с амплитудой 1,5–2 В. Возрастание амплитуды регистрируемого сигнала свидетельствовало об увеличении тока, протекающего через нанoelectрод, и, соответственно, увеличении площади поверхности углерода в кончике кварцевой трубки. В момент достижения достаточной амплитуды сигнала травление останавливали.

После протравливания в растворе 0,1 М KCl / 10 мМ NaOH обработанные заготовки переносили в 2 мМ раствор гексахлорплатиновой кислоты (H_2PtCl_6) для дальнейшего электрохимического осаждения платины на кончике капилляра, подавали на электрод сравнения потенциал симметричной пилообразной формы с амплитудой 0,8 В. Различия циклических вольтамперограмм нанoelectрода в ферроценметаноле в области отрицательных потенциалов до и после осаждения платины свидетельствуют об успешном осаждении платины на электрод (рис. 2А).

Полученные вольт-амперные характеристики были обработаны с помощью программы OriginPro 8 (OriginLab; 2018). Были получены средние значения тока при +800 мВ (пропорционален концентрации H_2O_2) относительно уровня тока при нулевом потенциале.

С использованием платинового электрода производили измерения уровня H_2O_2 в полученных образцах слезной

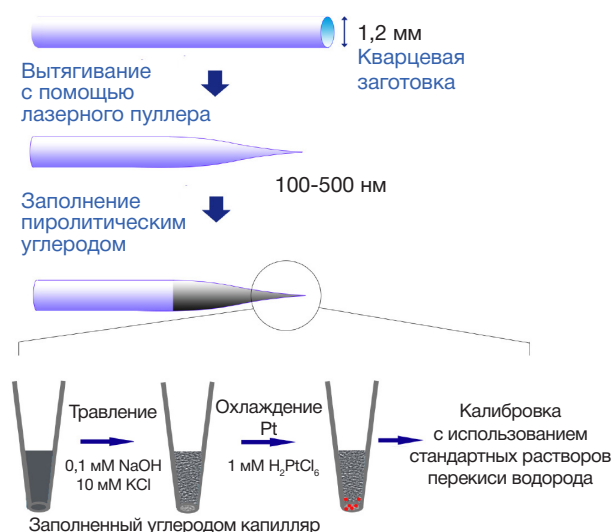


Рис. 1. Схема изготовления платиновых электродов

и внутриглазной жидкостей, погружая электрод и электрод сравнения в емкость с образцом. Фотография нанозлектродов представлена на рис. 2Б.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед измерениями каждый платиновый электрод калибровали с использованием ряда стандартных растворов H_2O_2 , строили калибровочную кривую, по которой определяли уровень H_2O_2 в образцах (рис. 2В)

Согласно калибровке, чем выше значение тока, тем больше концентрация H_2O_2 в образце. В левый глаз производили закапывание наночастиц СОД, в правый глаз в качестве контроля закапывали 0,01 М буфер PBS (рН = 7,4). Данные представлены для каждого кролика для 5 интервалов времени: до закапывания (контроль) и спустя 10, 30, 60 и 120 мин после последнего закапывания. Наблюдается некоторая вариативность в пределах одной временной группы в виду индивидуальных особенностей каждого подопытного кролика. Для всех животных характерно уменьшение уровня H_2O_2 с увеличением интервала времени, прошедшего после закапывания наночастиц.

Для визуализации динамики во времени ввиду значительной вариативности параметров среди подопытных животных для каждого кролика были рассчитаны разностные значения уровня H_2O_2 для образцов слезной жидкости из глаза, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали буфер. Полученные данные были усреднены и представлены для 5 кроликов в виде средних значений со стандартными ошибками (рис. 3). Показатели свидетельствуют о том, что в первые 30 мин после окончания введения лекарства наблюдается увеличение уровня H_2O_2 в глазу, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали PBS. Затем уровень АФК в обоих глазах становится примерно одинаковым.

Далее были измерены ионные токи для образцов внутриглазной жидкости. В левый глаз производили закапывание наночастиц СОД, в правый глаз в качестве контроля закапывали 0,01 М буфер PBS (рН = 7,4). После закапывания препарата наблюдали повышение уровня H_2O_2 во внутриглазной жидкости подопытных животных. С течением времени после воздействия наночастиц значительно увеличивалась вариативность исследуемого параметра в пределах одной временной группы. Полученные разностные данные были усреднены и представлены для 5 кроликов в виде средних значений со стандартными ошибками (рис. 4). Спустя 10 мин после окончания введения лекарства каких-либо достоверных отличий с контролем не наблюдали, однако через 30 мин начиналось увеличение уровня H_2O_2 в глазу, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали PBS.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение H_2O_2 в образцах слезной и внутриглазной жидкостей обусловлено действием СОД, катализирующей реакцию $2O_2^- + 2H_3O^+ \leftrightarrow O_2 + H_2O_2 + 2H_2O$.

Увеличение уровня H_2O_2 через 10 и 30 мин после начала закапывания и возвращение к исходному уровню спустя 1 ч в образцах слезной жидкости (куполообразный график) отличаются от динамики уровня АФК во внутриглазной жидкости, для которой характерен рост концентрации H_2O_2 только через 30 мин после добавления лекарства.

Проникновение СОД во внутриглазную жидкость затруднено, поэтому наблюдается латентный период, длящийся около 30 мин.

При увеличении концентрации СОД в слезной жидкости концентрация супероксид-радикалов значительно снижается, при этом увеличивается концентрация H_2O_2 (рис. 3).

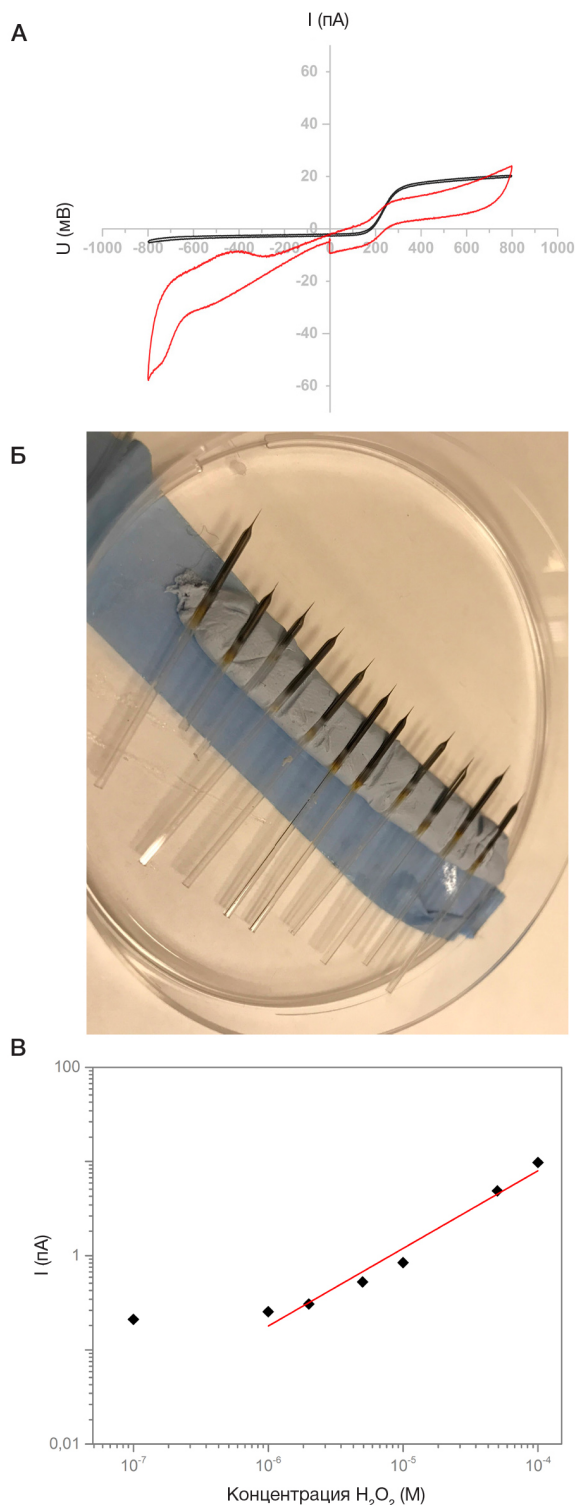


Рис. 2. А. Вольтамперные характеристики для нанозлектрода относительно Ag/AgCl (1 В/с). Циклические вольтамперограммы измерены в 1 мМ растворе ферроцен метанола. Черным показана вольтамперная характеристика для углеродного нанозлектрода, красным — после осаждения платины. **Б.** Фотография изготовленных нанозлектродов. **В.** Калибровочная прямая платинового электрода, используемого для определения концентрации H_2O_2 в образцах слезной и внутриглазной жидкостей

Максимальное увеличение концентрации H_2O_2 возникает через 30 мин, что свидетельствует о сдвиге равновесия реакции дисмутации супероксид-радикала в сторону образования H_2O_2 . Концентрация H_2O_2 через 1 ч возвращается к исходному уровню вследствие двух совместных процессов, протекающих в слезной жидкости: во-первых, концентрация наночастиц СОД спустя 1 ч значительно сокращается из-за вымывания с поверхности глаза, и снижается скорость образования H_2O_2 ; во-вторых, под воздействием антиоксидантной системы, присутствующей в слезной жидкости, протекают процессы разложения H_2O_2 до воды и кислорода.

Стоит отметить еще раз, что время жизни супероксид-радикалов из-за их реакционной способности достаточно мало и составляет около 10^{-6} с. Будучи нуклеофильным соединением, O_2^- способен окислять липопротеины и фосфолипиды мембран, что приводит к разрушению клеток [28]. Помимо дисмутации супероксид-радикала с образованием H_2O_2 , супероксид-радикал участвует в реакции Габера-Вайсса ($O_2^- + H_2O_2 \leftrightarrow OH^- + OH\cdot + {}^1O_2$). Поэтому сразу после отбора слезной жидкости генерация супероксид-радикалов в образце невозможна, поэтому все измерения основаны на изменении концентрации относительно устойчивой в физиологических условиях H_2O_2 .

В слезной жидкости достаточная концентрация препарата достигается сразу после закапывания, а во

внутриглазную наночастицы поступают с задержкой, поэтому увеличение концентрации H_2O_2 тоже происходит с небольшой задержкой.

Влияние местного применения обычных лекарств сильно затруднено защитными физиологическими барьерами глаза, которые эффективно уменьшают концентрацию препарата в месте введения [29]. Стабильность фермента, поглощенного клетками в форме наночастиц, значительно возрастает, по-видимому, из-за стабилизации молекулы фермента против метаболической деградации и / или лизосомного разрушения, благодаря чему увеличивается время циркуляции в области глазных тканей, по сравнению с нативным ферментом [30].

В дальнейшем существует возможность измерения уровня H_2O_2 непосредственно в глазных тканях с помощью нанозлектродов. Поскольку нанозлектроды имеют очень малый размер (100–500 нм), с их помощью можно проникнуть как в изолированные клетки, так и в область глазных тканей для измерения в режиме реального времени.

ВЫВОДЫ

Исследования с помощью платинового нанозлектрода могут иметь диагностическое значение в оценке протекания глазных патологий, связанных с воспалительными процессами. Оценка уровня H_2O_2 предложенным способом

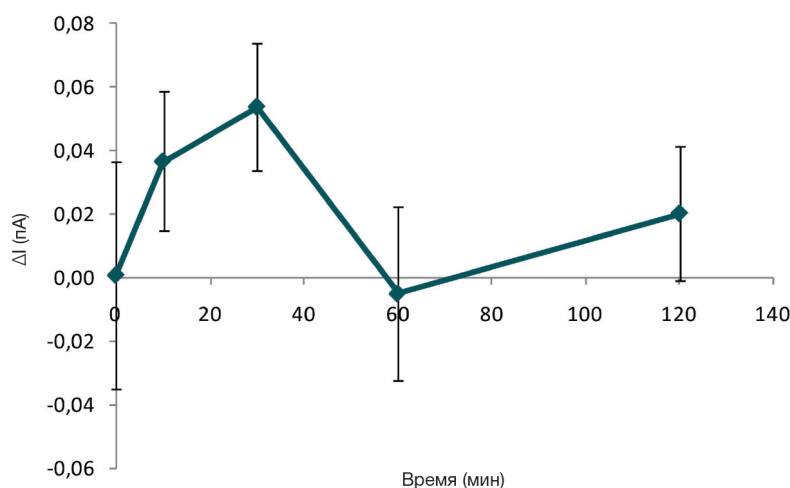


Рис. 3. Кинетика изменений АФК в образцах слезы кроликов после закапывания наночастиц СОД. Представлены усредненные данные для 5 кроликов со стандартными ошибками. Приведены разностные значения уровня АФК ΔI для образцов слезной жидкости из глаза, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали PBS-буфер

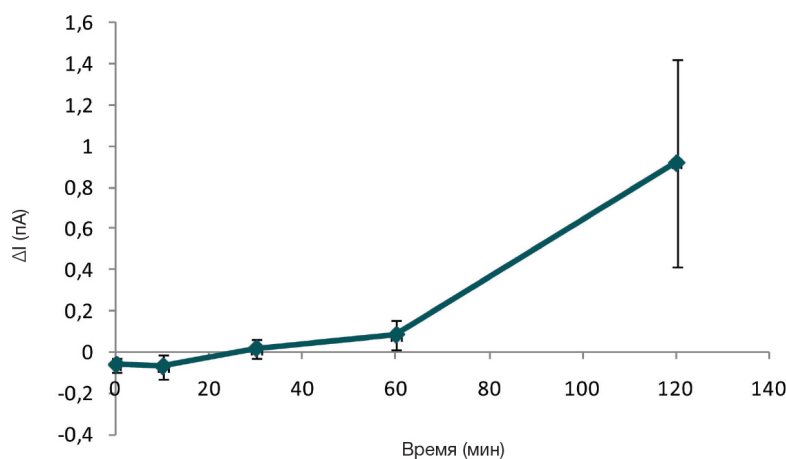


Рис. 4. Кинетика изменений АФК в образцах внутриглазной жидкости кроликов после закапывания наночастиц СОД. Представлены усредненные данные для 5 кроликов со стандартными ошибками. Приведены разностные значения уровня АФК ΔI для образцов слезной жидкости из глаза, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали PBS-буфер

позволяет обоснованно применять антиоксидантные препараты в лечении воспалений глаза. Технология проста и достаточно чувствительна, а эффективность по стоимости делает ее очень перспективной для биомедицинского применения. В работе показано, как производить

чувствительные платиновые наноэлектроды, которые могут быть использованы для определения АФК в биологических жидкостях. Мы пришли к выводу, что этот прямой метод более чувствителен и является перспективным в биологических прикладных исследованиях.

Литература

1. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: Наука/Интерпериодика, 2001; 343 с.
2. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science. 1978; 201 (4359): 875–80.
3. Кравчук Е. Л. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе заболеваний глаз. Вестник офтальмологии. 2004; 120 (5): 48–51.
4. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. Front Biosci (Schol Ed). 2011; (3): 52–60.
5. Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. The FASEB Journal. 1995; 9 (12): 1173–82.
6. Чеснокова Н. Б., Нероев В. В., Безнос О. В., Бейшеннова Г. А., Никольская И. И., Кост О. А., и др. Окислительный стресс при увеите и его коррекция антиоксидантным ферментом супероксиддисмутазой (экспериментальное исследование). Вестник офтальмологии. 2014; 130 (5): 30–5.
7. Niesman MR, Johnson KA, Penn JS. Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. Neurochemical research. 1997; 22 (5): 597–605.
8. Aio JL, Ayala MJ, Mulet ME, Artola A, Ruiz JM, Bellot J. Antioxidant therapy in the treatment of experimental acute corneal inflammation. Ophthalmic research. 1995; 27 (3): 136–43.
9. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. Journal of pineal research. 2004; 36 (1): 1–9.
10. Гулидова О. В., Любичий О. Б., Клебанов Г. И., Чеснокова Н. Б. Изменение антиокислительной активности слезной жидкости при экспериментальной ожоговой болезни глаз. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999; 128 (11): 571–4.
11. Choy CKM, Benzie IFF, Cho P. Ascorbic acid concentration and total antioxidant activity of human tear fluid measured using the FRASC assay. Investigative ophthalmology & visual science. 2000; 41 (11): 3293–8.
12. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of clinical pathology. 2001; 54 (5): 356–61.
13. Crouch RK, Goletz P, Snyder A, Coles WH. Antioxidant enzymes in human tears. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 1991; 7 (3): 253–8.
14. Грицук А. И., Сирота Т. В., Дравица Л. В., Крэдок Е. А.. Оценка состояния антиоксидантной активности слезной жидкости. Биомедицинская химия. 2006; 52 (6): 601–7.
15. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. The FEBS Journal. 1974; 47 (3): 469–74.
16. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. International journal of molecular sciences. 2011; 12 (5): 3117–32.
17. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radical Biology and Medicine. 2010; 49 (11): 1603–16.
18. Yamada M, Shichi H, Yuasa T, Tanouchi Y, Mimura Y. Superoxide in ocular inflammation: human and experimental uveitis. Journal of free radicals in biology & medicine. 1986; 2 (2): 111–7.
19. Ishimoto S, Wu G-S, Hayashi S, Zhang J, Rao NA. Free radical tissue damages in the anterior segment of the eye in experimental autoimmune uveitis. Investigative ophthalmology & visual science. 1996; 37 (4): 630–6.
20. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. Drug discovery today. 2008; 13 (3–4): 144–51.
21. Kost OA, Beznos O V, Davydova NG, Manickam DS, Nikolskaya II, Guller AE, et al. Superoxide dismutase 1 nanozyme for treatment of eye inflammation. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016; 2016 (1): 1–13.
22. Nukolova NV, Aleksashkin AD, Abakumova TO, Morozova AY, Gubskiy IL, Kirzhanova EA, et al. Multilayer polyion complex nanoformulations of superoxide dismutase 1 for acute spinal cord injury. Journal of Controlled Release. 2018; (270): 226–36.
23. Amatore C, Arbault S, Bouton C, Coffi K, Drapier J, Ghandour H, et al. Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization. ChemBioChem. 2006; 7 (4): 653–61.
24. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annual review of pharmacology and toxicology. 1983; 23 (1): 239–57.
25. Clausmeyer J, Actis P, Córdoba AL, Korchev Y, Schuhmann W. Nanosensors for the detection of hydrogen peroxide. Electrochemistry Communications. 2014; (40): 28–30.
26. Actis P, Tokar S, Clausmeyer J, Babakinejad B, Mikhaleva S, Cornut R, et al. Electrochemical nanopores for single-cell analysis. Acs Nano. 2014; 8 (1): 875–84.
27. Erofeev A, Gorelkin P, Garanina A, Alova A, Efremova M, Vorobyeva N, et al. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles. Scientific reports. 2018; 8 (1): 7462.
28. Deby C, Boes M, Pincemail J, Bourdon-Neuray J, Deby-Dupont G. Degradation of membrane phospholipids by a direct nucleophilic action of superoxide anion. In: Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids. Springer, 1990; p. 105–13.
29. Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. Journal of pharmaceutical sciences. 1998; 87 (12): 1479–88.
30. Manickam DS, Brynskikh AM, Kopanic JL, Sorgen PL, Klyachko NL, Batrakova EV, et al. Well-defined cross-linked antioxidant nanozymes for treatment of ischemic brain injury. Journal of controlled release. 2012; 162 (3): 636–45.

References

1. Zenkov NK, Lankin VZ, Men'shchikova EB. Okislitel'nyy stress: Biokhimicheskiy i patofiziologicheskiy aspekty. Moskva: Nauka/Interperiodika, 2001; 343 p.
2. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science. 1978; 201 (4359): 875–80.
3. Kravchuk EL. Rol' svobodnoradikal'nogo okisleniya v patogeneze zabolevaniy glaz. Vestnik oftal'mologii. 2004; 120 (5): 48–51.
4. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. Front Biosci (Schol Ed). 2011; (3): 52–60.
5. Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of

- action. The FASEB Journal. 1995; 9 (12): 1173–82.
6. Chesnokova NB, Neroev VV, Beznos OV, Beyshenova GA, Nikol'skaya II, Kost OA, et al. Okislitel'nyy stress pri uveite i ego korrektsiya antioksidantnym fermentom superoksiddismutazoy (eksperimental'noe issledovanie). Vestnik oftal'mologii. 2014; 130 (5): 30–5.
 7. Niesman MR, Johnson KA, Penn JS. Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. Neurochemical research. 1997; 22 (5): 597–605.
 8. Alio JL, Ayala MJ, Mulet ME, Artola A, Ruiz JM, Bellot J. Antioxidant therapy in the treatment of experimental acute corneal inflammation. Ophthalmic research. 1995; 27 (3): 136–43.
 9. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. Journal of pineal research. 2004; 36 (1): 1–9.
 10. Gulidova OV, Lyubitskiy OB, Klebanov GI, Chesnokova NB. Izmenenie antiokislitel'noy aktivnosti sleznoy zhidkosti pri eksperimental'noy ozhogovoy bolezni glaz. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 1999; 128 (11): 571–4.
 11. Choy CKM, Benzie IFF, Cho P. Ascorbic acid concentration and total antioxidant activity of human tear fluid measured using the FRASC assay. Investigative ophthalmology & visual science. 2000; 41 (11): 3293–8.
 12. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of clinical pathology. 2001; 54 (5): 356–61.
 13. Crouch RK, Goletz P, Snyder A, Coles WH. Antioxidant enzymes in human tears. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 1991; 7 (3): 253–8.
 14. Gritsuk AI, Sirota TV, Dravitsa LV, Kredok EA. Otsenka sostoyaniya antioksidantnoy aktivnosti sleznoy zhidkosti. Biomeditsinskaya khimiya. 2006; 52 (6): 601–7.
 15. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. The FEBS Journal. 1974; 47 (3): 469–74.
 16. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. International journal of molecular sciences. 2011; 12 (5): 3117–32.
 17. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radical Biology and Medicine. 2010; 49 (11): 1603–16.
 18. Yamada M, Shichi H, Yuasa T, Tanouchi Y, Mimura Y. Superoxide in ocular inflammation: human and experimental uveitis. Journal of free radicals in biology & medicine. 1986; 2 (2): 111–7.
 19. Ishimoto S, Wu G-S, Hayashi S, Zhang J, Rao NA. Free radical tissue damages in the anterior segment of the eye in experimental autoimmune uveitis. Investigative ophthalmology & visual science. 1996; 37 (4): 630–6.
 20. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. Drug discovery today. 2008; 13 (3–4): 144–51.
 21. Kost OA, Beznos O V, Davydova NG, Manickam DS, Nikolskaya II, Guller AE, et al. Superoxide dismutase 1 nanozyme for treatment of eye inflammation. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016; 2016 (1): 1–13.
 22. Nukolova NV, Aleksashkin AD, Abakumova TO, Morozova AY, Gubskiy IL, Kirzhanova EA, et al. Multilayer polyion complex nanoformulations of superoxide dismutase 1 for acute spinal cord injury. Journal of Controlled Release. 2018; (270): 226–36.
 23. Amatore C, Arbault S, Bouton C, Coffi K, Drapier J, Ghandour H, et al. Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization. ChemBioChem. 2006; 7 (4): 653–61.
 24. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annual review of pharmacology and toxicology. 1983; 23 (1): 239–57.
 25. Clausmeyer J, Actis P, Córdoba AL, Korchev Y, Schuhmann W. Nanosensors for the detection of hydrogen peroxide. Electrochemistry Communications. 2014; (40): 28–30.
 26. Actis P, Tokar S, Clausmeyer J, Babakinejad B, Mikhaleva S, Cornut R, et al. Electrochemical nanoprobe for single-cell analysis. Acs Nano. 2014; 8 (1): 875–84.
 27. Erofeev A, Gorelkin P, Garanina A, Alova A, Efremova M, Vorobyeva N, et al. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles. Scientific reports. 2018; 8 (1): 7462.
 28. Deby C, Boes M, Pincemail J, Bourdon-Neuray J, Deby-Dupont G. Degradation of membrane phospholipids by a direct nucleophilic action of superoxide anion. In: Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids. Springer, 1990; p. 105–13.
 29. Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. Journal of pharmaceutical sciences. 1998; 87 (12): 1479–88.
 30. Manickam DS, Brynskikh AM, Kopanic JL, Sorgen PL, Klyachko NL, Batrakova EV, et al. Well-defined cross-linked antioxidant nanozymes for treatment of ischemic brain injury. Journal of controlled release. 2012; 162 (3): 636–45.