



Биолог. журн. Армении, 3 (64), 2012

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Յ.Ա. ЗАКАРЯՆ, Ա.Է. ЗАКАРԻԱՆ, Ա.Ա. ԿՐԿՈՐԻԱՆ

Ереванский госуниверситет, кафедра биофизики
zaqare@mail.ru

Изучена интенсивность хемилюминесценции (ХЛ) и показатели свободнорадикального перекисного окисления липидов (ПОЛ) сыворотки крови больных периодической болезнью (ПБ) с помощью различных методов анализа ХЛ – спонтанной и индуцированной фото- или электро-ХЛ и определения продуктов ПОЛ. Показано, что параллельно с повышением температуры опытных образцов растет интенсивность спонтанной ХЛ. Однако кинетика интенсивности фото- и электро-ХЛ имеет характер экспоненциального уменьшения. Интенсивность ХЛ и ПОЛ сыворотки крови больных ПБ значительно выше по сравнению с уровнем ХЛ и ПОЛ здоровых людей (доноров), и эта разница заметно увеличивается во время приступа. Предполагается, что резкое изменение интенсивности ХЛ и показателей ПОЛ может отражать развитие патологического процесса при ПБ.

*Хемилюминесценция – фотохемилюминесценция – электрохемилюминесценция – антиоксидант –
сыворотка крови – свободные радикалы – периодическая болезнь*

Ուսումնասիրվել են պարբերական հիվանդությամբ հիվանդների արյան շիճուկի քեմիլյումինեսցենստումը (ՔԼ) և լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացումը (ԼԳՕ) ՔԼ-ի վերլուծության տարբեր մեթոդներով՝ ինքնաբերական, ֆոտո- և էլեկտրոնիդուկցման եղանակներով և ԼԳՕ վերջնանյութերի որոշման միջոցով: Ցույց է տրվել, որ ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց աճում է ինքնաբերական ՔԼ-ի ուժգնությունը: Իսկ ֆոտո- և էլեկտրո- ՔԼ ուժգնության կինետիկան ունի էքսպոնենցիալ նվազման բնույթ: Հիվանդների արյան շիճուկի ՔԼ-ի ուժգնությունը և ԼԳՕ ցուցանիշները նկատելիորեն բարձր են առողջ մարդկանց արյան շիճուկի ՔԼ-ի և լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման համեմատ և այդ տարբերությունը առավել մեծանում է հիվանդի նոպայի ժամանակ: Ենթադրվում է, որ ՔԼ-ի ուժգնության և ԼԳՕ ցուցանիշների կտրուկ փոփոխությունը կարող է արտացոլել ախտաբանական գործընթացների զարգացումը պարբերական հիվանդության ընթացքում:

*Քեմիլյումինեսցենստում – ֆոտոքեմիլյումինեսցենստում – էլեկտրաքեմիլյումինեսցենստում – հակաօքսիդանտ – արյան
շիճուկ – ազատ ռադիկալներ – պարբերական հիվանդություն*

The chemiluminescence (ChL) intensity and lipid peroxidation (LPO) parameters of blood serum for the patients with Mediterranean Fever was investigated by the methods of spontaneous and induced chemiluminescent analysis - spontaneous, photo- and electro-induced ChL and determination of end products of LPO. It was shown that the intensity of spontaneous ChL increased with the increasing of temperature, while the kinetics in course of photo- and electro-ChL was decreasing exponentially. The ChL intensity and LPO parameters of blood serum for the patients with Mediterranean Fever were remarkably higher than those for the control donors and, moreover, these differences were increasing even more during the crisis. It was suggested that the acute change

in the intensity of ChL and LPO can indicate pathologic processes being developed during Mediterranean Fever.

Chemiluminescence – photo-chemiluminescence – electro-chemiluminescence – antioxidant – blood serum – free radicals – mediterranean fever

К настоящему времени накоплены многочисленные данные об изменении уровня хемилюминесценции (ХЛ) при развитии различных патологических процессов в организме человека и животных и возможности использования этого метода анализа в клинической медицине [1,2,5,7,8,10,11]. Многими авторами эта проблема изучалась в разных биологических системах (кровь, моча, слюна и др.) при наличии различных патологических процессов в организме [1,4,8,9]. В указанных работах была установлена зависимость интенсивности ХЛ сыворотки и (или) плазмы крови при таких заболеваниях как атеросклероз, хирургические вмешательства, злокачественные процессы, язвенные и воспалительные болезни различной природы. Поскольку уровень ХЛ определяется образованием свободных радикалов (СР) и зависит от наличия антиоксидантов (АО) в системе, то была предложена гипотеза о том, что развитие патологических процессов в организме связано с образованием СР при перекисном окислении липидов (ПОЛ), взаимодействие которых с белками в мембранах и другими важнейшими компонентами клеток и разных биологических систем может приводить к различным нарушениям [3,4]. При этом надо учитывать то, что вклад в интенсивность ХЛ вносит СР-ное ПОЛ и перекисное окисление липидсодержащих структур.

Методы ХЛ и определение ПОЛ уже получили широкое распространение как в качестве биофизического теста для диагностики и оценки течения различных заболеваний, так и для изучения механизмов патологических процессов в организме. Однако они нуждаются в дальнейшей разработке.

В данной работе представлены результаты исследования ПОЛ сыворотки крови больных периодической болезнью (ПБ) с помощью ХЛ анализа и определением конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК).

Материал и методика. Материалом для исследования служили образцы донорской крови (контроль) и крови больных ПБ различного возраста и на различных стадиях заболевания. Исследовались образцы крови 29 здоровых доноров и 27 больных ПБ, предоставленные клиниками г. Еревана. Методика получения сыворотки крови не отличалась от ранее описанной [5,9].

Регистрацию спонтанной (СХЛ) и индуцированной ХЛ проводили на квантометрической установке с применением новых разработанных нами электронных узлов и усилительных схем, которая описана ранее [5,6].

Для изучения фотохемилюминесценции (ФХЛ) образцы сыворотки с открытой поверхностью облучали широким спектром ультрафиолетового (УФ) света с помощью лампы ПРК-4 в течение 1 мин на расстоянии от центра источника 5 см. Затем облученные образцы перемещали в измерительную ячейку полуавтоматическим способом в течение 1-2 сек и регистрировали ФХЛ. Облучение проводили при различной температуре. За это время температура испытуемого образца снижалась до 39°C.

Электрохемилюминесценцию (ЭХЛ) сыворотки крови исследовали с применением платиновых электродов в 0,1 М растворе KCl, при постоянном напряжении 10 В и силой тока 10 А. После установления стационарного уровня ЭХЛ раствора KCl в ячейку добавляли 0,2 мл образца сыворотки крови, разбавленной раствором KCl в 50 раз. Изменение интенсивности ЭХЛ при добавлении сыворотки служило мерой для оценки антиоксидантной или прооксидантной активности.

Для оценки интенсивности СР-ных процессов определяли продукты ПОЛ – МДА и ДК ранее описанными методами [5,8,9]. При этом для определения МДА использовали 2-тиобарбитуровую кислоту.

Полученные данные обрабатывали статистически с определением стандартной ошибки средних величин (стандартная ошибка не превышала 10 %, если не показано) и достоверности разницы результатов между образцами больных ПБ и в контроле ($p < 0.05$, если не показано) [5].

Результаты и обсуждение. Данные по исследованию температурной зависимости СХЛ сыворотки крови больных ПБ и здоровых людей (доноров) показали, что интенсивность СХЛ усиливается с возрастанием температуры от 35° до 60°С (рис. 1) со средним значением коэффициента Вант-Гоффа, равным 1.6 ($Q_{10}=1.6$), что указывает, скорее всего, на неферментативную природу СХЛ, обусловленную СР-ным окислением липидного состава сыворотки крови.

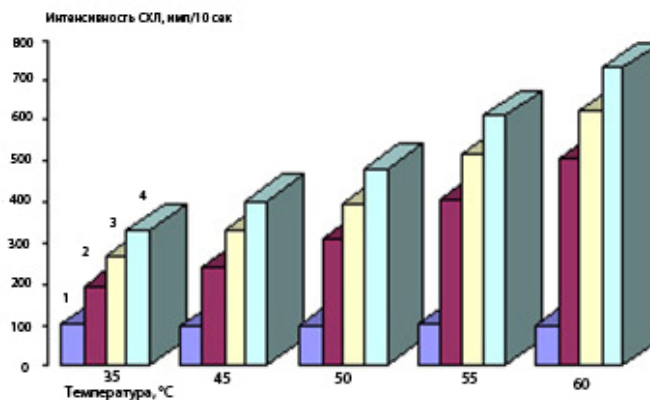


Рис.1. Влияние температуры на интенсивность СХЛ сыворотки крови здоровых и больных людей.

1- фоновая интенсивность (фон), 2- СХЛ сыворотки крови здоровых людей, 3- СХЛ сыворотки крови больных ПБ вне приступа, 4- СХЛ сыворотки крови больных ПБ в приступе.

Из приведенного материала (рис. 1) можно заключить, что заметная разница в интенсивности СХЛ образцов сыворотки донорской крови и крови больных ПБ и обнаруженные изменения интенсивности СХЛ в зависимости от температуры говорят в пользу того, что ПБ оказывает существенное влияние на параметры свечения сыворотки крови. Более того, видно, что уровень СХЛ сыворотки крови больных ПБ вне приступа значительно ниже по сравнению с СХЛ сыворотки крови больных ПБ, находящихся в приступе (рис. 1, диаграммы серии 3 и 4). Интенсивность СХЛ контрольных образцов (рис. 1, диаграммы серии 1) ниже по сравнению с СХЛ больных людей.

При изучении индуцированной ХЛ сыворотки крови ФХЛ закономерности полученных результатов были аналогичными с результатами СХЛ (рис. 2). Однако в этом случае интенсивность свечения значительно выше.

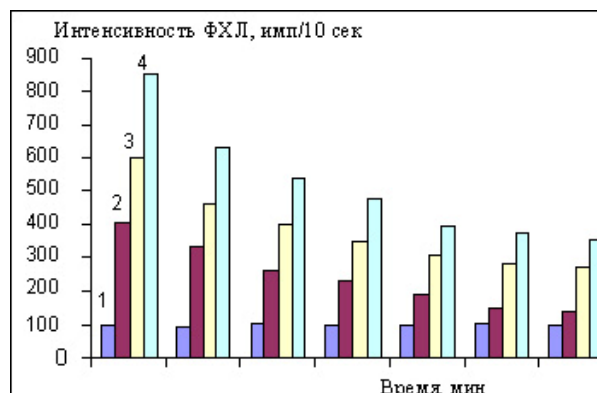


Рис.2. Кинетика интенсивности ФХЛ сыворотки крови здоровых и больных людей в течение 7 мин

1-фон, 2- ФХЛ сыворотки крови здоровых людей, 3- ФХЛ сыворотки крови больных ПБ вне приступа, 4- ФХЛ сыворотки крови больных ПБ в приступе.

Основным результатом этих исследований можно считать то, что уровень ФХЛ сыворотки крови больных выше (рис. 2, диаграммы серии 3 и 4) по сравнению с контролем (рис. 2, диаграммы серии 2) и заметно выше у больных в период приступа ПБ (рис. 2, диаграммы серии 4). Однако во всех этих случаях кинетические данные (в течение 7 мин, рис. 2) почти идентичны и имеют экспоненциальный характер, что указывает на наличие единой природы ХЛ и, скорее всего, ПОЛ липопротеинов сыворотки, поскольку белки липопротеинов в процессах ФХЛ играют, возможно, роль эмиттеров свечения [5,8,9].

Для комплексной оценки ХЛ исследовали сыворотку крови контрольных и больных людей также методом индуцированной ХЛ - ЭХЛ. По полученным данным (рис. 3), и в этом случае интенсивность свечения, вызванная добавлением разбавленной сыворотки, заметно выше в момент приступа по сравнению с ЭХЛ вне приступа и в контроле

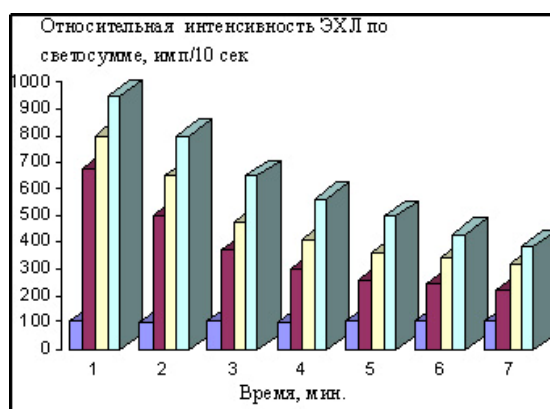


Рис.3. Кинетика светосуммы ЭХЛ сыворотки крови здоровых и больных людей. Обозначения как на рис. 2.

При суммировании данных об интенсивностях ХЛ сыворотки крови можно получить следующий ряд:

$$ХЛ_{\text{сыв. крови(контр)}} < ХЛ_{\text{вне приступа ПБ}} > ХЛ_{\text{в приступе ПБ}}.$$

С учетом того, что интенсивность ХЛ определяется и уровнем АО в сыворотке крови [3,4], на основании полученных данных по разным видам ХЛ можно предположить, что уровень АО в сыворотке крови больных ПБ заметно занижен и еще больше снижается в период приступа болезни.

Поскольку ХЛ и ПОЛ взаимосвязаны и почти полностью отражают протекание СР-ного процессов в липидных структурах и компонентах биологических систем (крови) [3,4], то изучали ПОЛ в сыворотке крови; полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1. Показатели ПОЛ сыворотки крови человека в норме и у больных ПБ (N-число людей)

Образцы Показатели ПОЛ	Сыворотка донорской крови, N = 17	Сыворотка крови больных ПБ вне приступа, N = 13	Сыворотка крови больных ПБ в приступе, N = 14
МДА, мкМ/мл	6.7 ± 0.7	7.6 ± 0.8	7.9 ± 0.85
МДА, мкМ/мг белка	0.13 ± 0.015	0.14 ± 0.018	0.15 ± 0.016
ДК, мкМ/мл	9.1 ± 0.9	9.7 ± 0.9	12.0 ± 1.2
Белок, мг/мл	68.0 ± 6.2	91.0 ± 10.3	97.0 ± 8.2

Из этих данных следует, что количество МДА и ДК в сыворотке крови увеличивается у больных ПБ, однако изменение ДК более существенно (табл. 1). По показателям ПОЛ можно получить нижеприведенный ряд:

$$\begin{aligned} МДА_{\text{сыв. крови(контр)}} < МДА_{\text{вне приступа ПБ}} < МДА_{\text{в приступе ПБ}} \\ ДК_{\text{сыв. крови(контр)}} < ДК_{\text{вне приступа ПБ}} < ДК_{\text{в приступе ПБ}}. \end{aligned}$$

Таким образом, анализируя полученные результаты, можно заключить, что все исследуемые показатели интенсивности различных видов ХЛ – СХЛ, ФХЛ и ЭХЛ, а также ПОЛ являются отражением процессов, протекающих в организме больного при развитии приступа ПБ. Результаты позволяют предположить изменение и в АО сыворотки крови, что может иметь важное значение в развитии патологических процессов в организме и в использовании различных АО в течение заболевания. Зависимость полученных эффектов усиления интенсивности ХЛ и ПОЛ от таких факторов, как возраст людей, пол, наличие сопутствующих заболеваний и др. не изучали; они могут стать предметом дальнейших исследований.

Можно предположить, что патологические процессы при ПБ включают механизмы с образованием СР при ПОЛ и изменение АО. Несмотря на то что молекулярно-клеточные и биофизические механизмы ПБ малоизвестны, изменения СР-ных процессов в сыворотке крови могут рассматриваться как существенный компонент, отражающий патологические изменения в организме. Возможно также, что корреляция в изменении интенсивности ХЛ и показателей ПОЛ при ПБ отражает СР-ную природу ХЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Авзалетдинова А.Р., Фазлыева Р.М., Фархутдинов Р.Р. и др.* Хемилюминесценция крови и мочи в дифференциальной диагностике ГЛПС. Клини. лаб. Диагностика, 5, с. 45-47, 1995.
2. *Арутюнян В.М., Григорян Е.Г., Акопян Г.С., Закарян А.Е. и др.* Хемилюминесцентный метод дифференциальной диагностики перитонитов различной этиологии. Росс. ж. гастроэнтерол., гинекол., колопроктол. 6, с. 196, 1996.
3. *Бурлакова Е.Б.* Биоантиоксиданты: новые идеи и повторение пройденного. Биоантиоксидант. Тюмень, 34 с., 1997.
4. *Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др.* Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники. Сер. биофизика. М., 29, с. 1-251, 1991.
5. *Закарян А.Е., Закарян З.А., Трчунян А.А.* Различные методы хемилюминесцентного анализа в оценке уровня свободнорадикального перекисного окисления липопротеинов сыворотки крови человека при развитии патологических процессов в организме. ДНАН Армении, 112, 1, с. 79-86, 2012.
6. *Закарян А.Е., Элбакян В.Л., Айвазян Н.М., Погосян Г.А., Закарян Н.А., Сеферян Т.Е., Трчунян А.А.* Основы метода хемилюминесцентного анализа и программное обеспечение LABVIEW для автоматической регистрации и математической обработки данных. Межд. научно-практ. конф. „Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LabVIEW и технологии National Instruments“, М., с. 429-432, 2006.
7. *Каясова Т.С., Маркин Н.А.* Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах. Лаб. дело, 9, с. 56-58, 1994.
8. *Тунян М.Ю., Лалаян Б.К., Закарян З.А., Лалаян К.Б., Закарян А.Е.* Хемилюминесценция цельной нестимулируемой слюны при комплексном лечении тканей протезного ложа и пародонта опорных зубов адаптогенами-антиоксидантами. Глобус науки, с. 39-44, 2007.
9. *Узункичян А.А., Мириджанян М.М., Асатрян А.Р., Закарян А.Е., Погосян Г.А., Закарян З.А.* Особенности перекисного окисления липидов у больных с послеоперационным перитонитом, осложненным синдромом энтеральной недостаточности. Мед. вестник Эребуни 40, 4, с. 43-46, 2009.
10. *Фархутдинов Р.Р.* Свободнорадикальные процессы в норме и при патологии. Сов. медицина, 9, с. 69-73, 1983.
11. *Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А.* Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине. Уфа, 90 с., 1995.

Поступила 05.09.2011