

УДК 577.357+616.61-002.1-008

Новые модельные системы индуцированной хемилюминесценции для биомониторинга свободнорадикальных процессов

**А. Е. Закарян, Н. М. Айвазян, Н. А. Казарян,
М.Ю. Тунян**

*ЕГУ, НИЗ МЗ РА
0049, Ереван, ул. А.Манукяна, 1*

Ключевые слова: хемилюминесценция (ХЛ), модельные системы, периодическая болезнь, диметилформамид, нонан, гломерулонефрит

Свободнорадикальное окисление липидов (СРО) – перманентный процесс для любых нормально функционирующих мембран [1]. Интенсивность этого процесса обусловлена, с одной стороны, гетерогенностью липидного содержания биомембран (а именно, степенью ненасыщенности их жирнокислотного состава) и, с другой стороны, работой антиоксидантной системы защиты организма от окислительной деструкции (ферментативной и неферментативной), регулирующей этот процесс [2,3]. В ходе нормальной жизнедеятельности клетки эти составляющие находятся в динамическом равновесии, и нарушение этого баланса ведет к патологии [4,5].

Процессы рекомбинации свободных радикалов, переноса электрона от анион-радикала на окислитель, а также распада органических эндоперекисей, являясь наиболее экзотермичными реакциями, в состоянии приводить к излучению квантов света в видимой части спектра и сопровождаться ХЛ. Добавление же в реакционную систему соединений, обладающих более высоким квантовым выходом люминесценции (т.н. активаторов или прооксидантов), может усилить излучение системы в результате миграции энергии возбуждения с продукта ХЛ реакции на молекулу активатора [6,7]. Интенсивность спонтанной ХЛ (СХЛ) – это качественный критерий наличия свободных радикалов в системе и изменений их уровня в режиме реального времени. Однако использование различных активаторов ХЛ позволяет судить также о количественных изменениях СРО характеристик системы.

Материал и методы

В опытах использовали растворы сывороточного альбумина человека (САЧ) и плазму крови больных периодической болезнью (ПБ), или средиземноморской лихорадкой, и хронической почечной недостаточностью (гломерулонефрит). Кровь для анализа брали у больных ПБ мужчин 25-40 лет вне приступа ($n=25$) и детей 8-14 лет ($n=30$), страдающих гломерулонефритом. Об интенсивности СРО судили на основании ХЛ анализа при помощи квантометрической установки на базе ФЭУ-139 [8]. Модельные системы (МС) для усиления ХЛ содержали нонан и олеиновую кислоту (ОК) – 2:0.2 (МС1) и диметилформамид и ОК – 2:0.2 (МС2).

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что модельные системы нонан-ОК и ДМФА-ОК наделены собственным свечением с довольно высоким квантовым выходом ХЛ [9]. При этом ни нонан, ни ДМФА не имеют сверхслабого свечения. Добавление ОК в растворители приводит к постепенному нарастанию излучения в случае нонана, с последующим достижением некоторого плато, в случае же ДМФА добавление ОК сразу приводит к появлению стабильного уровня свечения, которое в 2.5 раза превышает фоновое значение (рис. 1,2). Количественные отношения нонан/ДМФА:ОК:САЧ/пл. крови были выбраны эмпирически в результате серии экспериментов по выбору оптимальной концентрации для последних.

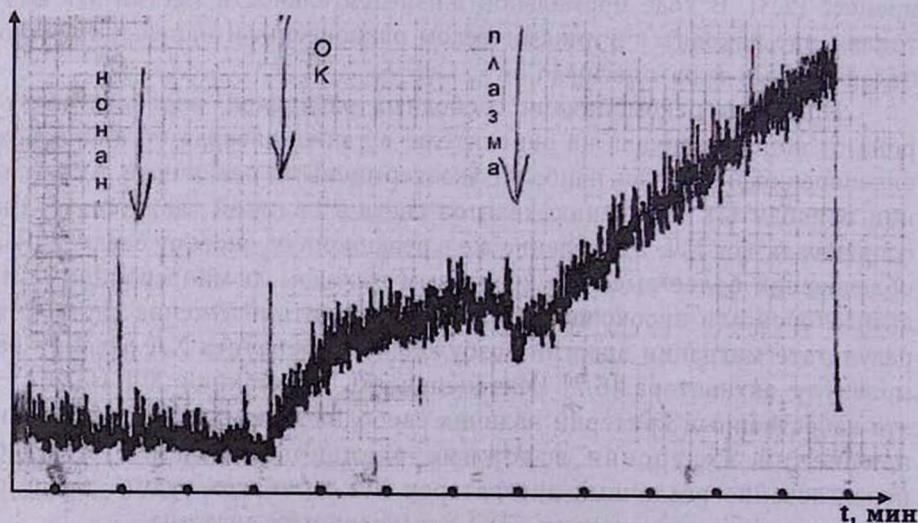


Рис.1. Кинетика интенсивности хемилюминесценции модельной системы нонан-ОК при добавлении биоматериала (САЧ)

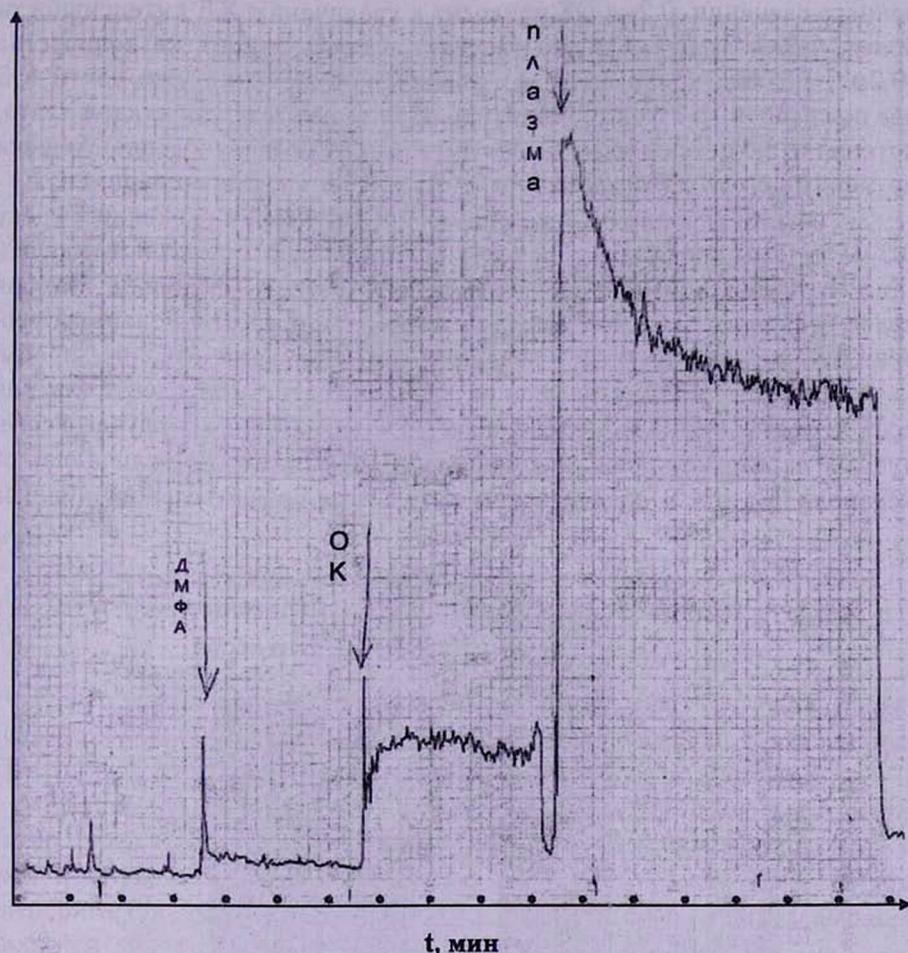


Рис.2. Кинетика интенсивности хемилюминесценции модельной системы ДМФА-ОК при введении биоматериала (САЧ)

Интересен тот факт, что температурная зависимость интенсивности свечения системы нонан:ОК:САЧ носит обратимый характер и позволяет утверждать, что характер усиления генерации квантов света с повышением температуры до 50°C является физико-химическим процессом.

Установленные закономерности кинетики индуцированной ХЛ для обеих систем (МС1, МС2) далее были апробированы на примере биологических образцов, таких как тканевые гомогенаты, кровь и плазма крови. Рассмотрим результаты последних.

На рис.1 представлена временная развертка изменений ХЛ интенсивности при поэтапном введении в среду реагентов. Как уже отмечалось, добавление к нонану, который практически не имеет собст-

венного свечения, 0.2мл ОК приводит к увеличению ХЛ интенсивности более, чем в 2 раза. Однако внесение в среду такого же количества (0.2мл) плазмы крови вызывает увеличение свечения уже почти в 5 раз по сравнению с фоном установки. При этом наступает стадия плато, которая отличается долговременным эффектом свечения, практически не меняющегося даже на вторые сутки после начала эксперимента.

Реакция усиления ХЛ в системе ДМФА-ОК при введении в среду 0.2 мл плазмы крови несколько отличается по кинетике от предыдущей (рис.2). Здесь явно наличие т.н. быстрой вспышки свечения, которая далее несколько затухает, выходя на определенный стационарный уровень ХЛ, который почти в 3 раза превышает свечение МС2 без пробы.

Подобные кривые излучения квантов света были идентичны для всех исследованных образцов (включая САЧ). Однако в случае исследуемых патологий уровни свечения систем значительно отличались от контроля. На рис.3 представлены результаты сравнительного анализа

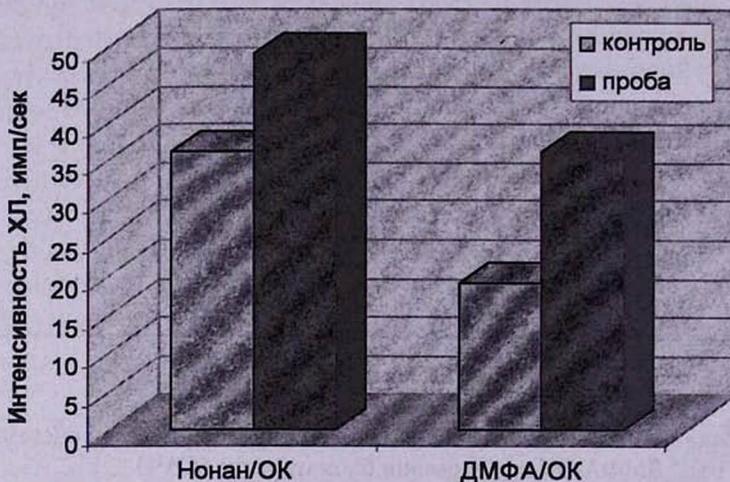


Рис.3. Интенсивность хемилюминесценции модельных систем нонан-ОК и ДМФА-ОК до и после введения плазмы крови больных ПБ во внеприступный период

интенсивности индуцированной ХЛ в указанных модельных системах плазмы крови больных ПБ. Как видно из опытных данных, по сравнению с плазмой крови здоровых людей, у больных наблюдается завышенный уровень процессов СРО в крови, хотя во внеприступный период внешних симптомов подобного воспаления у этих больных не отмечается.

Результаты экспериментов с плазмой крови больных хроническим гломерулонефритом свидетельствуют о том, что данный тип патологии сопровождается, в отличие от предыдущего, понижением уровня процессов СРО в крови (рис.4).

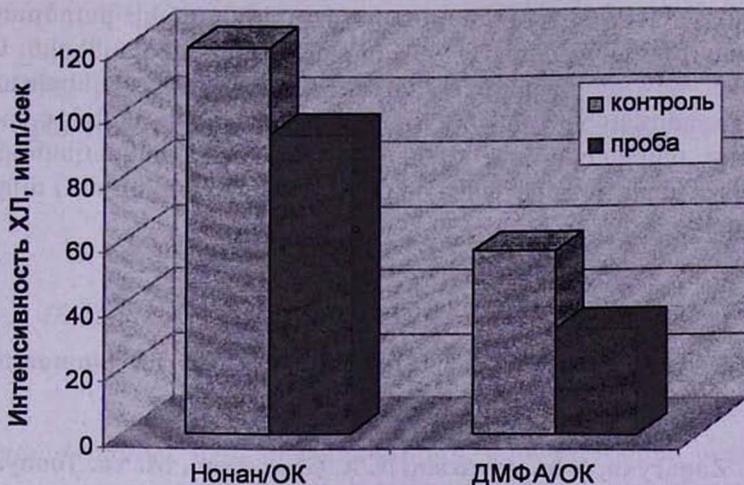


Рис.4. Интенсивность хемилюминесценции модельных систем нонан-ОК и ДМФА-ОК до и после введения плазмы крови больных хроническим гломерулонефритом

Необходимо отметить, что данные закономерности были подтверждены также экспериментами по определению уровня ПОЛ при помощи ТБК-теста и анализами спонтанной ХЛ образцов [10,11].

Таким образом, предложенные модельные системы могут адекватно отражать тенденции течения СРО реакций в исследуемых образцах, но при этом позволяют работать с очень малым количеством экспериментального материала, что в случае клинических исследований является значительным преимуществом.

Поступила 17.12.08

Ինդուկցված քեմոլյումինեսցենցիայի նոր մոդելային համակարգերը ազատ ռադիկալային պրոցեսների մոնիթորինգի համար

**Ա.Շ. Չաքարյան, Ն.Մ. Այվազյան, Ն.Ա. Գազարյան,
Մ.Յու. Թունյան**

Մշակվել են նոր մոդելային համակարգեր արյան պլազմայի քեմոլյումինեսցենցիայի ինդուկցիայի համար: Որպես ազատ ռադիկալների գեներատոր օգտագործվել է մոմանի և դիմեթիլֆորմամիդի խառնուրդ օլեինաթթվի հետ:

Յույց է տրված, որ նշված համակարգերը ցուցաբերում են կայուն

լուսարձակում, որը կենսաբանական մոլուխի ավելացումից զգալիորեն բարձրանում է: Քեմոլյումինեսցենցիայի մակարդակի բարձրացման օրինաչափությունները բնորոշ են տարբեր պաթոլոգիաներին: Ապացուցված է, որ պարբերական հիվանդությամբ հիվանդների արյան պլազմայի քեմոլյումինեսցենցիայի ինտենսիվությունը ավելի բարձր է, քան առողջ մարդկանց մոտ: Միևնույն ժամանակ գլոմերուլոնեֆրիտով հիվանդների մոտ (քրոնիկ երիկամային անբավարարություն) այդ ցուցանիշը ցածր է:

New model systems of enhanced chemiluminescence for biomonitoring of free radical processes

A.Ye. Zaqaryan, N.M. Ayyazian, N. A. Ghazaryan, M. Yu. Toonyan

Some new model systems for enhancing blood serum chemiluminescence (ChL) are presented. As a generator of free radicals there were used the mixes of nonane and dimethylformamide with oleic acid.

It is shown that these systems have a stable superweak shining, which is significantly increased after addition of biomaterial. The regularities of chemiluminescence level increase are distinctive for different pathologies.

Also it is shown that the enhanced ChL response of blood in kidney insufficiency pathology is noticeably low compared to blood serum of healthy people and very high in model systems with Familial Mediterranean Fever.

Литература

1. *Արությունյան В.М., Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Акопян Г.С., Григорян К.А.* Вестник МАНЭБ, 1999, N7(19), с.108-111.
2. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биомембранах. М., 1972.
3. *Гуськов Е.П., Клецкий М.Е., Корниенко И.В. и др.* Докл. РАН, 2002, т.383, 3, с. 405-408.
4. *Закарян А.Е., Цагикян А.Р., Погосян Г.А.* Биол. журн. Армении, 1990, т. XLIII, 1, с. 51-54.
5. *Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Карагезян К.Г.* Докл. РАН, 2000, т.374, 1, с. 111-114.
6. *Закарян А.Е., Геворкян А.А., Акопян Г.С. и др.* Сб. науч. трудов ЕрГМУ, 1997, т.2, с.49-51.
7. *Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993, .90, p. 7915-7922.
8. *Boonstra J., Post J.A.* Gene, 2004, v. 337, p. 1-13.
9. *Fridovich I. J. Biol. Chem., 1997, 272, 30, p. 18515-18517.*
10. *Hengen P.N.* Trends Biochem. Sci., 1997, 22, 8, p. 313-314.
11. *Stadtman E.R.* Ann. N.Y. Acad. Sci., 2001, 928, p. 2-38.