

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Т.С. Петренко, И.А. Новикова, А.В. Гомоляко

УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Беларусь

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) биологических мембран с участием активных форм кислорода является постоянно протекающим в организме процессом, обеспечивающим нормальный метаболизм клеток через регуляцию проницаемости клеточных мембран и активности мембранных ферментов. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления (СРО) поддерживается на определённом стационарном уровне за счет ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной защиты (АОЗ). Нарушение баланса в сложной системе взаимодействия ПОЛ/АОЗ лежит в основе патогенеза различных заболеваний воспалительной и невоспалительной природы. Поэтому лабораторная оценка интенсивности СРО представляет значительный интерес для клинической медицины как способ мониторинга и оценки эффективности терапии патологических процессов.

Для оценки состояния системы ПОЛ/АОЗ в лабораторной практике используют определение концентрации в плазме различных продуктов, образующихся в процессе цепного окисления липидов (диеновые конъюгаты, сопряженные триены, основания Шиффа, малоновый диальдегид и др.), а также факторов антиоксидантной защиты (активность СОД, каталазы, глутатионредуктазы, церулоплазмينا и др.). Перспективным способом комплексной оценки интенсивности СРО в различных биологических жидкостях является регистрация хемилюминесценции (ХЛ) – сверхслабого свечения, возникающего при взаимодействии радикалов. Однако для широкого внедрения ХЛ в практику клинко-диагностических лабораторий требуется совершенствование технологии выполнения анализа для обеспечения его максимальной информативности.

Цель настоящего исследования – оптимизация методических подходов к оценке параметров свободнорадикального окисления плазмы крови в тесте индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции.

Материалом для исследования служила плазма крови 24 практически здоровых людей. В качестве антикоагулянта использовали гепарин из расчета 10 ЕД гепарина на 1 мл крови. До проведения исследования плазму хранили различные промежутки времени (30, 60, 90 и 120 минут) при комнатной температуре (20°C). Наблюдение ХЛ осуществляли в следующей тест системе: плазма крови + трис-буфер (рН 8,8) + раствор сернокислого железа (25 мМоль/л или 50 мМоль/л) + 0,1% раствор люминола (5 амино-2,3-дигидро-1,4-фталазинэдион). Для инициации люминолзависимой хемилюминесценции использовали свежеприготовленный 3% раствор перекиси водорода. Регистрация ХЛ осуществлялась сразу после добавления перекиси (100 мкл) в течение 5 минут с помощью флюориметра/спектрофотометра Cary Eclipse FL1002M003. Оценивали значения следующих показателей: интенсивность свечения – I_{\max} (в условных единицах, у.е.); площадь под кривой хемилюминесценции – светосумма (S, у.е.²); начальную скорость нарастания свечения – V_0 (у.е./с), которую рассчитывали как отношение половины максимальной вспышки к времени, за которое произошло нарастание интенсивности ХЛ до половины максимального значения; время выхода на максимум свечения ХЛ – t (в секундах, с).

Внесение индуктора (H_2O_2) в тест систему, состоящую из плазмы, буфера, раствора двухвалентного железа (50 мМоль/л) и люминола, приводило к быстрому нарастанию сигнала. При этом на кинетической кривой ХЛ наблюдалась быстрая вспышка – резкий подъём до I_{\max} в течение 0,1 секунды, с постепенным снижением и переходом в стационарное свечение. Такое резкое нарастание ХЛ затрудняло анализ начальной скорости нарастания свечения (V_0), поэтому мы исследовали параметры ХЛ в тест-системах с содержанием двухвалентного железа 25 мМоль/л. При этом было получено более медленное нарастание ХЛ, значения V_0 составили 0,06 (0,05;0,09) вместо 0,03 (0,027;0,032) $p=0,006$, тогда как по другим оцениваемым параметрам значимых различий не выявлялось. Показатели ХЛ составили: $I_{\max} = 1,2$ (0,8;1,3), $S = 23,1$ (17,1;31,0), $t=0,031$ (0,029;0,032) при концентрации сернокислого железа 50 мМоль/л и 1,1 (0,8;1,2), 25,9 (17,0;32,9), 0,030 (0,029;0,39) соответственно при использовании 25 мМоль/л раствора.

Известно, что анализ ПОЛ рекомендуется производить не позднее, чем через 2 часа после получения материала, однако ряд авторов указывают на изменение параметров липопероксидации плазмы уже через 30 минут хранения. Для определения времени, в течение которого параметры ХЛ будут стабильны, мы провели ряд экспериментов с плазмой доноров, оценивая основные параметры ХЛ через 30, 60, 90 и 120 минут после взятия материала. Выявлено, что значения I_{\max} , V_0 , t в плазме здоровых лиц не имели статистически значимых различий в зависимости от длительности хранения материала. Так, I_{\max} при хранении плазмы в течение 30, 60, 90, 120 минут при комнатной температуре составила 0,97 (0,39;1,2), 0,98 (0,39;1,21), 0,92 (0,4;1,21) и 0,95 (0,39;1,23) у. е. соответственно, а начальная скорость ХЛ (V_0) – 0,059 (0,027;0,89), 0,056 (0,028;0,085), 0,06 (0,028;0,089), 0,06 (0,027;0,088) у.е./с соответственно. Время достижения I_{\max} колебалось от 0,029 до 0,06 секунд и не изменялось при хранении в течение 30-120 минут. Светосумма ХЛ (S) через 30 минут хранения составила 22,5 (16,4;29,2) у.е., через 60 минут – 28,4 (20,8;36,1), через 90 минут – 30,3 (19,2;42,0) и через 120 минут 57,0 (48,8;61,4). Различий между S плазмы при хранении в течение 60 и 90 минут нами не обнаружено, зато имелась статистически значимая разница по значению S этого временного интервала с другими (30 минут и 120 минут). Это указывает на необходимость выполнения анализа плазмы в течение 1-1,5 часов с момента взятия материала.

Не имеется единого мнения по поводу оптимального времени регистрации ХЛ. Одни ученые (Ю.А. Владимиров и др., 1976) считают, что регистрацию свечения необходимо проводить не менее 30 минут, другие (В.А. Шестаков и др., 1979) полагают достаточной регистрацию сигнала в течение 60 с, фиксируя лишь быструю вспышку ХЛ. Мы проанализировали параметры ХЛ плазмы через 30, 60 и 300 секунд наблюдения. Анализ кривых ХЛ показал, что через 30 секунд от начала регистрации свечения не во всех образцах плазмы наблюдался максимальный подъем. Через 60 секунд после введения в систему индуктора I_{\max} была достигнута во всех образцах плазмы доноров. В то же время в 4 анализируемых пробах через 2-3 минуты от начала регистрации наблюдалась вторая волна ХЛ («медленная вспышка»), которая отражает процесс накопления конечных продуктов свободнорадикального окисления. Поэтому для обеспечения возможности регистрации обеих вспышек ХЛ плазмы крови наиболее целесообразно проводить запись свечения не менее 5 минут.

Проведенные исследования позволили определить оптимальные условия получения воспроизводимых результатов оценки люминол-индуцированной хемилюминесценции плазмы крови и установить значения диапазона нормальных значений, что является необходимым этапом для внедрения метода в практику работы клинико-диагностических лабораторий.