

Петренко Т.С., Новикова И.А.  
Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Petrenko T.S., Novicova I.A.  
Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

## Характеристика параметров люминол-зависимой хемилюминесценции липидов плазмы крови пациентов с рецидивирующими респираторными инфекциями

Characteristic the parameters of luminol chemiluminescence  
of blood plasma lipids in patients with recurrent respiratory  
infections

### Резюме

В статье представлены результаты оценки активности свободнорадикального окисления липидов плазмы крови у 41 пациента с рецидивирующими инфекциями верхних дыхательных путей, полученные с использованием двух различных подходов – спектрофотометрического определения продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ). Выявлено повышение активности свободнорадикального окисления у пациентов вне зависимости от метода оценки. Установлена взаимосвязь параметров ХЛ с продуктами липопероксидации нейтральных липидов и в меньшей степени – фосфолипидов. Значения максимальной интенсивности и светосуммы ХЛ ассоциированы с накоплением в плазме оснований Шиффа, а начальной скорости нарастания свечения – с первичными и вторичными продуктами ПОЛ. Индекс соотношения  $I_{\max}/S$  (отношение интенсивности хемилюминесценции к площади под кривой) позволяет оценить степень сбалансированности изменений в системе «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» на фоне активации свободнорадикальных процессов и прямо взаимосвязан с содержанием оснований Шиффа в изопропанольной фазе плазмы.

**Ключевые слова:** свободнорадикальное окисление, люминол-зависимая хемилюминесценция, рецидивирующие инфекции верхних дыхательных путей.

### Resume

In article presents the results of evaluation of activity of free radical oxidation in the plasma lipids in 41 patients with recurrent upper respiratory tract infections, obtained using the two different ap-

proaches – spectrophotometric determination of the products of peroxide oxidation of lipids (POL) and luminol chemiluminescence (CL). Found increased activity of free radical oxidation in patients regardless of the method of evaluation. The interrelation of parameters with the of lipid peroxidation products of neutral lipids and to a lesser extent, phospholipids. The maximum intensity and SCL associated with the accumulation in the plasma bases Schiff, and the initial rate of rise of the luminescence – with primary and secondary products of the peroxide oxidation of lipids. The index of the ratio of the  $I_{max}/S$  allows you to evaluate the level of harmonization of changes in the system of POL/antioxidants on the background of activation of free radical processes and is directly correlated with the content of bases Schiff in isopropanol phase of the plasma.

**Key words:** free radical oxidation, luminol chemiluminescence, recurrent infections of the upper respiratory tract.

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Рецидивирующие инфекции верхних дыхательных путей (РИВДП) – социально значимая проблема в связи с широкой распространенностью среди детского и взрослого населения. При этом в последние 10 лет наблюдается увеличение числа тяжелых и часто рецидивирующих форм заболеваний [1].

В современной научной литературе оценке процессов свободно-радикального окисления (СРО) посвящены многочисленные исследования [2–5]. Установлено, что активация СРО – универсальная неспецифическая реакция, необходимая для обеспечения метаболических и адаптационных процессов в организме [6]. В то же время нарушение баланса между интенсивностью прооксидантных и антиоксидантных процессов может лежать в основе патогенеза ряда заболеваний. Поэтому в клинической практике оценка состояния системы «перекисное окисление липидов (ПОЛ) – антиоксидантная защита (АОЗ)» может быть интересна для контроля за течением патологического процесса и оптимизации тактики лечения [2–4, 6, 7–9].

Наиболее удобно и клинически информативно для характеристики процессов ПОЛ спектрофотометрическое определение продуктов последовательных окислительных превращений гидроперекисей липидов [5, 6, 9]. Оценку антиоксидантного звена осуществляют по активности его ферментных компонентов (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатион и др.) и содержанию неферментных продуктов (церулоплазмин, аскорбиновая кислота, альфа-токоферол, флавоноиды и полифенолы, мочевины, мочевиная кислота, цистеин и др.) [7–8]. Учитывая многокомпонентность редокс-системы организма и сложность взаимодействий между различными ее составляющими, ведутся поиски подходов, позволяющих произвести суммарную оценку про- и антиокислительной активности биологических жидкостей [2, 5, 11, 12]. Одним из таких методов является определение интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ). Однако в отношении трактовки результатов ХЛ до настоящего времени ведется интенсивная дискуссия, остается неясным вопрос о соответствии результатов ХЛ содержанию продуктов ПОЛ в биологических системах.

## ■ ЦЕЛЬ

Интерпретировать параметры люминол-зависимой хемилюминесценции липидов плазмы на основе сопоставления показателей свободнорадикального окисления, полученных хемилюминесцентным и спектрофотометрическим методами, у пациентов с рецидивирующими инфекциями верхних дыхательных путей.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Был обследован 41 пациент с рецидивирующими инфекциями респираторного тракта в возрасте от 18 до 45 лет (36 пациентов с хроническим тонзиллитом, 3 – с хроническим ларингитом и 2 – с фаринготонзиллитом) с числом обострений более 4 раз в год. Все пациенты находились в стадии ремиссии заболевания и не имели обострений сопутствующих инфекционно-воспалительных заболеваний. При этом в исследование не включались пациенты с тяжелыми формами сопутствующей патологии: инсультами, инфарктами, сахарным диабетом, ишемической болезнью сердца, злокачественными новообразованиями, острыми и хроническими заболеваниями печени (цирроз, гепатиты) и почек, тяжелой бронхолегочной патологией. Контрольную группу составили 24 практически здоровых лица, сопоставимых по полу и возрасту.

Материалом для исследования служила плазма периферической крови, которую исследовали в течение не более 1–1,5 часов после взятия крови. Полученную плазму делили на две части. В одной из них спектрофотометрически определяли содержание первичных (диеновые конъюгаты – ДК), промежуточных (сопряженные триены – СТ) и конечных (основания Шиффа – ОШ) продуктов ПОЛ, которое рассчитывали по отношению E232/E220 (ДК), E278/E220 (СТ), E400/E220 (ОШ); результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.). Продукты ПОЛ определяли в гептановых и изопропанольных экстрактах плазмы. Необходимость использования 2 фаз вызвана особенностями экстрагирования: в гептан извлекаются из плазмы в основном нейтральные липиды, а в изопропанол – фосфолипиды, которые являются важнейшими субстратами ПОЛ [5]. Во втором образце оценивали параметры люминол-зависимой хемилюминесценции. Для этого использовали тест-систему, состоящую из 1 мл трис-буфера (рН = 8,8), 0,1 мл 25 ммоль/л раствора сернистого железа, 0,1 мл раствора люминола (1 г/л) и 0,1 мл плазмы [11]. Инициацию ХЛ вызывали добавлением к системе 0,1 мл раствора перекиси водорода (30 г/л), после чего в течение 5 минут осуществляли регистрацию результатов на флюориометре/спектрофотометре Cary Eclipse FL1002M003. Оценивали следующие параметры ХЛ:

- интенсивность свечения –  $I_{\max}$  (у.е.);
- площадь под кривой хемилюминесценции – светосумма люминол-зависимого свечения в течение 5 минут (S, у.е.);
- время достижения пика ХЛ – t (мин);
- начальную скорость нарастания свечения –  $V_0$  (у.е./мин), которую рассчитывали как отношение половины максимальной вспышки ко времени, за которое произошло нарастание интенсивности ХЛ до половины максимального значения.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов статистики – U-критерия Манна–Уитни, корреляционный анализ – метода Спирмена. Данные представлены как медиана и интерквартильный размах (25%; 75%). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные при использовании различных подходов к оценке параметров редокс-системы у пациентов с РИВДП, представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, параметры системы перекисного окисления липидов у пациентов с РИВДП в период ремиссии заболевания отличались от таковых у клинически здоровых лиц. При этом содержание первичных и вторичных гептан-растворимых продуктов плазмы (ДК и СТ) было ниже ( $p = 0,021$ ,  $p < 0,001$ ), а конечных продуктов (ОШ) перекисидации нейтральных липидов и фосфолипидов – выше в сравнении с контрольной группой ( $p = 0,007$ ,  $p = 0,004$  соответственно).

Типичный вид хемилюминесцентной кривой (усредненные значения у пациентов и здоровых лиц), а также анализируемые нами параметры ХЛ представлены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, после внесения в тест-систему перекиси водорода (отмечено стрелкой) наблюдалась быстрая вспышка, которая сменялась постепенным спадом, и кривая ХЛ выходила на длительное плато. По данным большинства исследователей, максимальное значение интенсивности ХЛ ( $I_{\max}$ ) пропорционально концентрации предшествующих гидроперекисей и свидетельствует в наибольшей степени об исходном содержании продуктов ПОЛ в биологических жидкостях

У пациентов с РИВДП в целом активность перекисидации нейтральных липидов изменялась в большей степени, чем фосфолипидов.

**Таблица 1**  
Параметры СРО плазмы крови у пациентов с РИВДП

Наименование показателя, единицы измерения	Здоровые лица (n = 24)	Больные РИВДП (n = 41)
<b>Показатели перекисидации нейтральных липидов (гептановая фаза)</b>		
ДК, е.и.о.	0,642 (0,593; 0,707)	0,589 (0,512; 0,662)*
СТ, е.и.о.	0,412 (0,331; 0,478)	0,290 (0,198; 0,335)*
ОШ, е.и.о.	0,022 (0,017; 0,035)	0,033 (0,028; 0,049)*
<b>Показатели перекисидации фосфолипидов (изопропанольная фаза)</b>		
ДК, е.и.о.	0,676 (0,643; 0,707)	0,669 (0,600; 0,708)
СТ, е.и.о.	0,436 (0,414; 0,475)	0,426 (0,342; 0,483)
ОШ, е.и.о.	0,020 (0,012; 0,026)	0,026 (0,024; 0,055)*
<b>Показатели ХЛ</b>		
$I_{\max}$ , у.е.	0,97 (0,39; 1,20)	2,00 (0,97; 2,94)*
S, у.е.	57,0 (48,8; 61,4)	106,0 (93,0; 129,0)*
$V_{gr}$ , у.е./мин	1,4 (1,1; 3,2)	2,3 (1,2; 3,5)
t, минут	0,4 (0,3; 0,5)	1,2 (0,6; 1,3)*
$I_{\max}/S$	0,017 (0,01; 0,02)	0,016 (0,01; 0,02)

Примечания:

\* – различия статистически значимы при  $p < 0,05$ ; данные представлены в виде Me (25%; 75%).

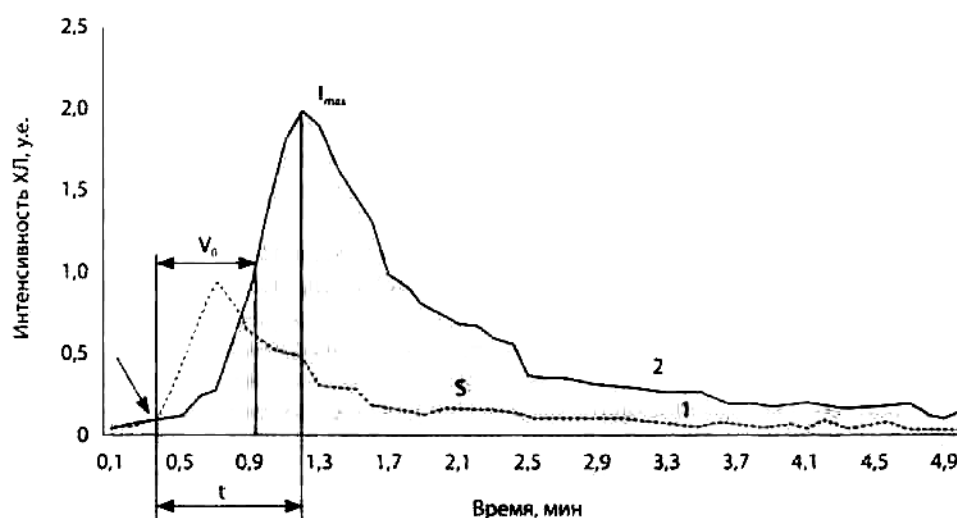


Рис. 1. Типичные кривые хемилюминесценции плазмы крови

Примечания:

стрелкой указан момент добавления перекиси;

1 - кривая ХЛ плазмы доноров;

2 - кривая ХЛ плазмы пациентов с РИВДП; площадь под кривой ХЛ (S) закрашена серым цветом.

[2, 10–12]. В то же время определенный вклад вносит активность присутствующих в исследуемом материале антиоксидантов [2, 4, 11, 12]. Площадь под кривой ХЛ (светосумма, S) характеризует общую антиоксидантную активность биоматериала и связана с ней обратной зависимостью: чем меньше S, тем больше активность АОЗ [10–12]. Эти параметры – основные при проведении люминол-зависимого анализа ХЛ, они используются большинством исследователей. Некоторые специалисты рекомендуют дополнительно определять время, в течение которого интенсивность ХЛ достигает максимума (t), и начальную скорость нарастания свечения – интенсивность радикалообразования ( $V_0$ ) [11, 13]. Используемые нами параметры позволяют к тому же дополнительно определить антиоксидантный резерв исследуемого биологического материала и скорость образования свободных радикалов [11, 13].

У обследованных пациентов по сравнению с группой здоровых лиц выявлено значимое увеличение значений  $I_{max}$  ( $p = 0,001$ ), светосуммы ХЛ (S,  $p < 0,001$ ) и времени достижения максимума свечения ( $p = 0,001$ ). В то же время начальная скорость радикалообразования ( $V_0$ ) в плазме крови больных статистически достоверно не отличалась от контрольных значений. Полученные результаты свидетельствуют об активации процессов липопероксидации на фоне снижения резервов антиоксидантной защиты. Для анализа степени сдвига и характеристики адапционных процессов рядом исследователей предложено рассчитывать индекс соотношения  $I_{max}/S$ , являющийся интегральным показателем сбалансированности про-/антиоксидантной системы [12, 14, 15]. В нашем исследовании значения этого индекса не отличались от значений у здоровых лиц, что указывает на адаптивный характер

инесущихся сдвигов активности системы СРО и отсутствие окислительного стресса.

Проведенный нами корреляционный анализ позволил установить, что параметры ХЛ у обследованных пациентов были взаимосвязаны в максимальной степени с продуктами липопероксидации нейтральных липидов, но не фосфолипидов. Так, среди продуктов фосфолипидпероксидации значимыми оказались только взаимосвязи ОШ с  $I_{max}$ , S, t и  $I_{max}/S$  (рис. 2). При этом все изученные параметры пероксидации нейтральных липидов (первичные, вторичные и конечные продукты) были взаимосвязаны с показателями ХЛ. Значения светосуммы ХЛ (S) и времени достижения пика (t) одинаково коррелировали с интермедиатами ПОЛ – отрицательные корреляции с ДК и СТ, но положительные – с ОШ. Интенсивность радикалообразования ( $V_0$ ) была прямо ассоциирована с первичными и вторичными продуктами липопероксидации (ДК и СТ), а  $I_{max}$  – только с конечными продуктами (ОШ нейтральных липидов и фосфолипидов). В целом следует отметить, что характер взаимосвязей с параметрами ХЛ у первичных и вторичных продуктов ПОЛ (ДК и СТ) был одинаковым: отрицательные связи с показателями S и t, но положительная взаимосвязь с  $V_0$ . Аналогично и у конечных продуктов ПОЛ: как ОШ фосфолипидпероксидов, так и ОШ нейтральных липидов равнозначимо коррелировали с параметрами  $I_{max}$ , S и t.

Полученные результаты указывают на то, что параметры  $I_{max}$  и S ассоциированы в наибольшей степени с накоплением ОШ в биологической жидкости, а  $V_0$  – с первичными и вторичными продуктами ПОЛ.

Таким образом, анализ активности системы СРО с использованием двух различных методик позволил в целом получить аналогичную информацию. При этом преимуществом спектрофотометрии следует считать возможность выявления дисбаланса внутри цепного процесса превращения продуктов липопероксидации, которая отсутствует при определении ХЛ. Еще одно важное достоинство этого метода – воз-

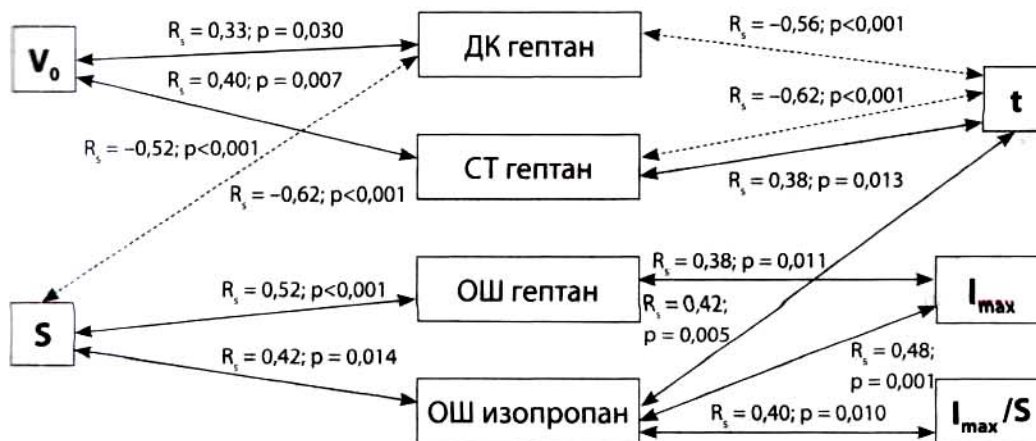


Рис. 2. Взаимосвязи между параметрами ПОЛ плазмы у пациентов с РИВДП

Примечание:  
 ←————→ прямые связи; ←-----→ обратные связи.

Одно из преимуществ ХЛ – получение представления о состоянии системы СРО в целом и возможность оценки степени ее сбалансированности.

возможность отдельного определения продуктов перекисидации фосфолипидов и нейтральных липидов. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование хемилюминесцентного анализа как первичного (скринингового) в оценке процессов СРО в организме, а спектрофотометрическое определение продуктов ПОЛ – как метод количественного анализа, отражающий более конкретные механизмы нарушений.

## ■ ВЫВОДЫ

1. В плазме крови пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями верхних дыхательных путей в стадии ремиссии заболевания спектрофотометрическим методом выявлено снижение относительно здоровых лиц содержания первичных и вторичных продуктов окисления нейтральных липидов, но увеличение количества конечных продуктов (оснований Шиффра) нейтральных липидов и фосфолипидов.
2. Методом люминол-зависимой хемилюминесценции в этих же образцах плазмы обнаружено статистически значимое повышение интенсивности свечения ( $I_{\max}$ ), светосуммы ( $S$ ) и времени достижения максимума свечения ( $t$ ) в сравнении с донорами.
3. Параметры хемилюминесценции липидов плазмы у пациентов с рецидивирующими респираторными инфекциями преимущественно взаимосвязаны с продуктами липоперекисидации нейтральных липидов, но не фосфолипидов. Значения  $I_{\max}$  и  $S$  ассоциированы в наибольшей степени с накоплением оснований Шиффра в плазме, а  $V_0$  – первичных и вторичных продуктов ПОЛ.
4. Расчет соотношения  $I_{\max}/S$  позволяет оценить степень сбалансированности изменений в системе «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» на фоне активации свободнорадикальных процессов и прямо взаимосвязан с содержанием оснований Шиффра в изопропанольной фазе плазмы.

## ■ ЛИТЕРАТУРА

1. Петрова, Л.Г. Терапия хронических и рецидивирующих инфекций верхних дыхательных путей / Л.Г. Петрова, И.В. Сидоренко // Оториноларингология в Беларуси. – 2010. – № 1(01). – С. 80–85.
2. Клебанов, Г.И. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина / Г.И. Клебанов и др. // Вопросы медицинской химии. – 2001. – № 3. – С. 13–21.
3. Зиятидинова, Г.К. Оценка интегральной антиоксидантной емкости плазмы крови по ее реакции с супероксидным анион-радикалом / Г.К. Зиятидинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 12–15.
4. Беляков, Н.А. Антиоксидантная активность биологических жидкостей человека: методология и клиническое значение / Н.А. Беляков, С.Г. Семесько // Эфферентная терапия. – 2005. – Т. 11, № 1. – С. 5–21.

5. Волчегорский, И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Т. 35, № 1. – С. 127–130.
6. Величковский, Б.Т. Свободнорадикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды / Б.Т. Величковский // Вестник РАМН. – 2001. – № 6. – С. 45–52.
7. Титов, В.Н. Регуляция перекисного окисления *in vivo* как этапа воспаления. Олеиновая кислота, захватчики активных форм кислорода и антиоксиданты / В.Н. Титов, Д.М. Лисицын // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 3–11.
8. Шанин, Ю.И. Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия проведения) / Ю.И. Шанин, В.Ю. Шанин, Е.В. Зиновьев. – СПб., 2003. – 128 с.
9. Шепелев, А.П. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 110–116.
10. Владимиров, Ю.А., Проскурина, Е.В. Лекции по медицинской биофизике: учебное пособие – М.: Изд-во МГУ; ИКЦ «Академкнига», 2007. – 432 с.: ил.
11. Методические рекомендации МР1.2.2028-05 «Использование неинвазивных методов контроля АО баланса организма в мониторинговых гигиенических исследованиях». – М., 2006.
12. Аристова, Н.А. Механизмы хемилюминесценции в реакции Фентона / Н.А. Аристова [и др.] – М., 2011.
13. Владимиров, Ю.А. Хемилюминесценция сыворотки крови в присутствии солей двухвалентного железа / Ю.А. Владимиров, Р.Р. Фархтдинов, М.Н. Молоденков // Вопросы медицинской химии. – 1976. – Т. XXII. – Вып. 2.
14. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.

Поступила в редакцию 21.06.2012  
Контакты: Petrenko\_T.S@mail.ru