

35. Jonson E.S., Fishman H.R.// Lancet. — 1982. — Vol. 1. — P. 913—914.

36. Mattea E.// Acta urol. belg. — 1960. — Vol. 28. — P. 313—330.

37. Mihael A.F., Drumnoud K.N., Doeden D. et al.// J. Clin. Invest. — 1964. — Vol. 43. — P. 1730—1747.

38. Roe F.J.// Jhum. Nutr. — 1979. — Vol. 33. — P. 254—256.

39. Thompson J.M., Peek M., Rodrigues F.// J. Urol. — 1987. — Vol. 137. — P. 401—403.

40. Wilkis Z.J.R., Comstock J.W.// Amer. J. Epidemiol. — 1981. — Vol. 114. — P. 178—190.

Поступила 04.04.96.

УДК 616—053.2—07:535.379

## КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

О.И. Пикуза, Е.И. Адо, В.Ю. Делян

Кафедра детских болезней № 1 (зав. — проф. О.И. Пикуза)  
Казанского государственного медицинского университета

Кардинальное повышение качества оказания медицинской помощи требует дальнейшего совершенствования методов диагностики, лечения и профилактики различных заболеваний. В этой связи особое значение приобретает изучение молекулярных механизмов наиболее ранних, неспецифических патологических реакций, которые предшествуют и являются основой развития многих заболеваний.

Согласно современным представлениям, многие жизненно важные метаболические процессы тесно связаны со свободнорадикальным окислением липидов. Липиды, содержащиеся во всех живых клетках и их органеллах, в норме постоянно соседствуют с растворенным молекулярным кислородом. Это создает объективные предпосылки для их окисления, в ходе которого образуются свободные радикалы (СР). Обладая высокой реакционной способностью, СР рекомбинируют между собой. Взаимодействия СР сопровождаются излучением освобождающейся энергии в форме квантов видимого света. Спонтанное свечение, возникающее при химических реакциях за счет энергии реагирующих веществ, называется хемилюминесценцией (ХЛ). Она присуща всем тканям и клеткам живого организма и происходит постоянно, пока в ткани продолжаются обменные процессы, удерживаются на стационарном уровне благодаря функционированию биоантиоксидантных (БАО) систем и является одним из показателей гомеостаза [9, 12, 20].

Активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) осуществляется, как теперь известно, под влиянием множества воздействий: ультрафиолетовой и ионизирующей радиаций, авитаминозов А, В, С, Е, воспалительных заболеваний, различных видов интоксикации, сердечно-сосудистых заболеваний [4, 5, 30, 32]. Следовательно, этот процесс неспецифичен, прямо не связан с особенностями действия различных агентов и патологических состояний.

Одним из перспективных методов обнаружения СР является регистрация сверхслабого свечения, которое возникает в момент взаимодействия радикалов. В настоящее время созданы специальные приборы — люцинометры, позволяющие количественно оценить интенсивность ХЛ [25]. Результаты исследования выражаются в импульсах в 1 с. Наиболее информативным показателем кинетического процесса является светосумма свечения, то есть площадь поверхности под кинетической кривой в относительных единицах [7, 10].

Метод регистрации ХЛ в настоящее время получил в клинике всеобщее признание, что обусловлено рядом причин. Во-первых, интенсивность ХЛ является интегральным показателем, который позволяет оценить состояние системы ПОЛ БАО [4] и по отклонению его от нормы судить о наличии и выраженности патологического процесса в организме. Во-вторых, чувствительность его по сравнению с другими способами обнаружения СР, например ЭПР, более высокая. Кроме того, этот метод прост, удобен в исполнении и исключает нарушение структурной целостности биологического материала [4].

Для диагностики различных заболеваний и патологических состояний организма методом регистрации ХЛ могут служить различные биологические жидкости — сыворотка и плазма крови, моча, слюна.

Бесспорно, что наиболее ценным объектом исследования является кровь. С одной стороны, кровь как внутренняя среда организма наиболее полно отражает сдвиги в тканях и органах, происходящих под влиянием разнообразных внешних воздействий, усредняя реакции отдельных органов и систем. С другой стороны, пробы крови в отличие от гомогенатов и тканевых проб характеризуются более стабильным уровнем свечения, что в клинических условиях особенно важно.

Спонтанная ХЛ сыворотки крови в норме имеет некоторые особенности в зависимости от возраста и пола. Более высокая интенсивность спонтанного свечения имеет место в периоды наиболее активного роста и развития организма. У новорожденного наблюдается относительно невысокий уровень процессов свободнорадикального окисления, однако интенсивность их значительно возрастает у грудных детей и детей раннего возраста. У детей более старшего возраста отмечается снижение процессов СР окисления. Зрелый возраст, отличающийся более совершенной регуляцией гомеостаза, характеризуется минимальным уровнем спонтанной ХЛ сыворотки крови. Имеющиеся возрастные отличия позволяют использовать ХЛ сыворотки как один из объективных критериев биологического возраста [4, 6]. ХЛ зависит и от пола. Оказалось, что сыворотка крови женщин имеет более низкую интенсивность свечения, чем у мужчин. Это связано, по-видимому, с присутствием в женском организме большого количества стероидных гормонов, которые опосредованно влияют на процессы ПОЛ [6].

В последнее время метод регистрации интенсивности спонтанной и индуцированной (искусственное стимулирование) ХЛ как диагностический тест находит все более широкое применение. В литературе имеется много сообщений об успешном использовании этого метода для диагностики и определения тяжести ряда воспалительных процессов: аппендицита, холецистита, острого панкреатита, перитонита [29], активной фазы ревматизма [26], острой пневмонии [3], туберкулеза [15], пиело- и гломерулонефрита [16].

При обследовании больных с наличием острого воспаления в брюшной полости (аппендицита, холецистита, панкреатита, перитонита) выявлено значительное повышение ХЛ сыворотки крови, причем по мере нарастания воспалительных явлений, генерализации процесса нарастает и интенсивность свечения крови. При переходе же воспаления в деструктивные формы наблюдается угнетение свечения. Исследование ХЛ может использоваться с целью дифференциальной диагностики острых воспалительных процессов органов брюшной полости и инфаркта миокарда (ИМ) с выраженным и даже ведущим абдоминальным синдромом, так как показатели свечения крови при этих двух процессах отличаются разнонаправленным характером. Это и позволяет в сложных клинических ситуациях предупредить неоправданные оперативные вмешательства у больных с ИМ. По мере стихания воспаления на фоне проводимой терапии показатели ХЛ значительно снижаются и постепенно приходят в норму, что может быть использовано для оценки эффективности терапии [29]. Имеются данные об использовании интенсивности ХЛ как одного из критериев необходимости применения методов экстракорпоральной детоксикации: гемо- и лимфосорбции, плазмафереза у больных с острым воспалением в брюшной полости, осложненным эндотоксикозом [21].

Исследование ХЛ плазмы крови у детей при ревматизме [26], пиело- и гломерулонефрите [16], пневмонии [3] показало значительное (от 2 до 5 раз) повышение ее в активной фазе заболевания и отчетливое снижение по мере стихания процесса. Тяжелое течение воспалительного процесса сопровождалось более интенсивным длительным свечением. При обследовании детей с острой пневмонией снижение ХЛ являлось prognostически неблагоприятным признаком и свидетельствовало о деструкции ткани легких. Описанные изменения интенсивности ХЛ связывают с поступлением в кровь из очагов деструкции низкомолекулярных полипептидов [3, 30].

Метод ХЛ сыворотки крови, наряду с существующими цитохимическими и цитоморфологическими методами, может быть использован для дифференциальной диагностики в гематологии [20]. Обнаружено, что различные варианты острого лейкоза, а также хронический лимфолейкоз характеризуются типичными изменениями параметров свечения. Кроме того, оказалось, что с возрастанием тяжести процесса наблюдается максимальное, типичное для данного варианта лейкоза отклонение соответствующих параметров свечения от нормы. Исследование ХЛ у больных острым лимфолейкозом показало, что при помощи ХЛ могут быть выявлены такие клеточные дефекты, которые не обнаруживались с помощью обычных цитохимических и иммунологических методов.

Метод регистрации ХЛ может быть использован в качестве дополнительного критерия для диагностики лимфогрануломатоза. Интенсивность свечения плазмы крови при этом заболевании была в 2—5 раз больше, чем у доноров. После лечения параметры ХЛ снижались и во многих случаях приближались к соответствующим величинам у доноров [20, 34].

При обследовании детей раннего возраста с различной степенью гипотрофии было выявлено увеличение интенсивности ХЛ сыворотки крови. Прослеживалась корреляция между увеличением интенсивности свечения и тяжестью дистрофических расстройств [22]. Выявление закономерности свидетельствует о значительной роли усиления ПОЛ в развитии данной патологии и позволяет наметить пути коррекции нарушенного гомеостаза, в частности включения в комплексное лечение детей с дистрофией препаратов, направленных на уравнивание процессов ферментативного и свободно-радикального окисления [23].

Широкое применение ХЛ нашла также и в иммунологии. С помощью регистрации интенсивности свечения было определено содержание в плазме антигенов и антител [36], эстриола, ферритина, тиреотропина и многих других веществ [9, 37]. Для этого использовалось связывание одного из реагентов с ХЛ-меткой, изменяющей энергетическое состояние во время иммунологической реакции. Чувствительность данного метода выше, чем у радиоиммунного анализа.

Значительный интерес представляет изучение фагоцитарного статуса по реактивной ХЛ естественно или искусственно стимулированных клеток [8, 18]. Данный метод изучения фагоцитоза удобен тем, что позволяет работать с очень малыми объемами крови, не подвергая ее фракционированию. Кровь пригодна в разведении 1:100 — 1:200, можно использовать капиллярную кровь [12]. Кроме технических удобств работа с высокоразведенной кровью позволяет свести к нулю влияние гуморальных факторов, чего нельзя добиться при помощи других методов без трудоемких и небезразличных для клеток процедур. Итоговая реакция определяется нейтрофильными гранулоцитами (НГ); другие лейкоциты люминесцируют (окисляют люминофоры) гораздо слабее [31], при этом уровень ХЛ зависит не столько от количества НГ, сколько от их функционального состояния.

Изменение функционального состояния НГ происходит в ответ на широкий спектр стимулирующих воздействий. Активация гранулоцитов обозначается как “респираторный взрыв” и характеризуется продукцией биологически активных форм кислорода: супероксидного анион-радикала, гидроксильного радикала, перекиси водорода и синглетного кислорода. В гранулоцитах имеются две бактерицидные системы, в которых используются продукты “респираторного взрыва”: миелопероксидазная и кислородзависимая [35]. Путем комбинации различных модификаций хемолуминометрии можно дифференцированно изучать эти две системы. Выявлена следующая закономерность: собственная (не усиленная люминофорами) ХЛ отражает суммарную активность кислородных и других радикалов. Люминолзависимая ХЛ (ЛМ-ХЛ) тесно связана с системой миелопероксидазы —  $H_2O_2$  и ассоциирована с бактерицидной активностью [33]. Люцигензависимая ХЛ (ЛГ-ХЛ) отражает продукцию супероксидного анион-радикала и не связана с миелопероксидазой. ЛМ-ХЛ и ЛГ-ХЛ отражают исходный уровень метаболической активности НГ, а индуцированная свидетельствует об их способности отвечать на стимуляцию “респираторным взрывом”. В качестве индуктора “респираторного взрыва” используются опсонизированные частицы, например опсонизированный зимозан. Таким образом, ХЛ нейтрофильных гранулоцитов может использоваться для исследования опсонинопосредованных реакций фагоцитов, позволяет судить об их функциональной перестройке при различных заболеваниях, а также выявлять врожденные пороки кислородзависимого метаболизма.

Некоторые результаты подобных исследований НГ уже получили клиническую оценку.

В частности, этот метод использовался для дифференциальной диагностики кардиопатий [13, 14], патологических состояний новорожденных [25]. Отмечалось повышение ХЛ у больных с различными клиническими вариантами воспаления — при острых пневмониях [3, 30], хронических заболеваний толстой кишки (неспецифический язвенный колит, хронический колит [17]), септических состояниях [25], пищевой токсикоинфекции [23], раневой и менингококковой инфекциях [24]. В последнем случае прослежена корреляция между реактивностью НГ и течением заболевания: высокие показатели совпадали с гладким течением, низкие — служили прогностическим неблагоприятным признаком.

Наряду с ХЛ крови обнаружено спонтанное и индуцированное сверхслабое свечение мочи человека [2, 28]. По данным М. Асанова и А.И. Журавлевой [2], моча имеет определенный показатель сверхслабого свечения, соответствующий норме и характеризующий физиологический уровень перекисных радикальных процессов в организме здоровых людей.

Повышение уровня ХЛ мочи отмечено у больных пиело- и гломерулонефритом [16], по-видимому, в результате накопления продуктов ПОЛ при активации СР реакций. При различных нефрологических заболеваниях (токсических поражениях почек, пиело- и гломерулонефрите), сопровождающихся нарушением выделительной и концентрационной функций почек, независимо от этиологии наблюдалось снижение интенсивности свечения мочи, степень угнетения которого зависела от тяжести нарушения функций почек, в частности коррелировала с клиренсом креатинина. Восстановление концентрационной и выделительной функций почек в ходе лечения сопровождалось повышением ХЛ мочи. В связи с этим появились основания считать возможным и правомочным использование метода регистрации свечения мочи для оценки функциональной активности почек [27].

Использование метода регистрации ХЛ особенно предпочтительно в педиатрии, так как ввиду его высокой чувствительности, технической простоты возможен скрининг большой популяции детей. Открывается перспектива раннего выявления сдвигов в системе фагоцитарной защиты и распознавания патологического процесса на доклиническом этапе его формирования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аряев Н.А. Тканевая терапия. — Одесса, 1983.
2. Асанов М., Журавлева А.И. В кн.: Сверхслабое свечение в медицине и сельском хозяйстве. — М., 1974.
3. Балтийская Н.В., Коркина Л.Г. и др. // Тер. арх. — 1991. — № 12. — С. 41—45.
4. Барабай В.А. Хемилюминесцентный метод в биологии и медицине. — Киев, 1978.
5. Барабай В.А., Ли Ен БИИ // Укр. биохим. журн. — 1982. — № 3. — С. 330—331.
6. Барабай В.А., Орел В.Э. Биохемилюминесценция. — М., 1983.
7. Владимиров Ю.А., Оленев В.И., Суслов Т.В. Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике. — М., 1974.
8. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция клеток животных. — Итоги науки и техники. — Серия "Биофизика". — М., ВНИИТИ, 1989. — Т. 24.
9. Власенко Н.Б., Гаврилова Е.М. // Журн. Всесоюз. хим. общества им. Д.И. Менделеева. — 1989. — № 1. — С. 24—29.
10. Журавлев А.И. Проблемы техники в медицине. — Тольятти, 1981.
11. Журавлев А.И., Мурашко В.В., Шерстнев М.П., Антонова О.В. // Бюлл. экспер. биол. — 1984. — № 11. — С. 596—598.
12. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Шергин С.М. // Лаб. дело. — 1990. — № 12. — С. 33—35.
13. Калмыков С.В., Романовская В.И., Филковский В.И. // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 72—74.
14. Корочкин И.М., Клебанов И.М., Чукаева И.И. и др. // Тер. арх. — 1984. — № 8. — С. 29—31.
15. Куликова Л.А., Мамонтова А.В., Каменская В.В. и др. Биохемилюминесценция. — М., 1983.
16. Майданник В.Г., Афонина Г.Б., Бордянос В.Г., Багдасарова И.В. // Педиатрия. — 1989. — № 12. — С. 43—46.
17. Маянская И.В., Лозовская Л.И., Ашкинази В.И., Гришина М.В. Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций / Под ред. А.Н. Маянского. — Горький, 1989.
18. Маянский А.Н., Невмятуллин А.Л., Чеботарь И.В. // Журн. микробиол. — 1987. — № 1. — С. 109—115.
19. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и психофизиология. — М., 1981.
20. Серкиз Я.И., Чеботарев Е.Е. и др. Хемилюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии. — Киев, 1984.
21. Совцов С.А. Люминесцентный анализ в медико-биологических исследованиях. — Рига, 1990.
22. Строганова Л.А. Расстройства питания, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта и вопросы организации детского здравоохранения. — М., 1980.
23. Строганова Л.А. Теоретические и практические аспекты изучения питания человека. — М., 1980.
24. Сусанова В.Ф., Маянский А.Н., Невмятуллин А.Л., Иванова Р.И. // Педиатрия. — 1989. — № 7. — С. 40—43.
25. Таболин В.А., Володин Н.Н. // Педиатрия. — 1986. — № 10. — С. 23—25.
26. Туровец Г.М. Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике. — М., 1974.
27. Фархутдинов Р.Р., Кантюков С.А. Материалы II Всесоюзного симпозиума по хронобиологии и хрономедицине. — Уфа, 1985.
28. Фархутдинов Р.Р., Кантюков С.А., Ахмадеев Р.И. Санаторно-курортное лечение больных воспалительными заболеваниями почек. — Ашхабад, 1982.
29. Фатихов Р.Г. Хемилюминесценция крови в диагностике некоторых неотложных состояний в хирургии: Автореф. дисс. канд. мед. наук. — Уфа, 1983.
30. Юлдашев М.Г., Фархутдинов Р.Р. // Педиатрия. — 1992. — № 4. — С. 14—16.
31. Ernst M.N., Fisher H. // J. Clin. Biochem. — 1983. — Vol. 21. — P. 555—559.
32. Fisher H., Ernst M. Luminescent Assay Perspectives in Endocrinology and Clinical Chemistry — Ed. M. Serio, New York, 1982.
33. Horan T.D., Erolsh D., Mc. Pherson T. Clin. immunol. immunopath. — 1982. — Vol. 22. — P. 259—269.
34. Jadavji T., Biggar W.D. et al. // Pediatrics. — 1986. — Vol. 78. — P. 21—25.
35. Klebatoff S. // Am. intern. Med. — 1980. — Vol. 93. — P. 480—489.
36. Luminescence immunoassay. Alternativen Zum Radioimmunoassay / Arztl. Lab. — 1983. — Bd. 29. — S. 75—91.
37. Praff J.J., Woldming M.G., Villarins L. // J. Immunol. Meth. — 1978. — Vol. 21. — P. 179—185.