

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.36-07:616.152-073.537.9

Сажина Н.Н.¹, Попов И.Н.², Титов В.Н.³

СРАВНЕНИЕ ДВУХ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ПАТОЛОГИЕЙ ПЕЧЕНИ

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва;

²НИИ антиокислительной терапии, Берлин, Германия;

³ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ, 121552, Москва

Проведена сравнительная оценка антиокислительной активности (АОА) сыворотки крови больных с патологией печени двумя хемилюминесцентными методами с разными моделями свободнорадикального окисления: «Hb-H₂O₂-люминол» и «АБАП-люминол». Выявлена достоверная, но не высокая корреляция результатов ($r = 0,798$), что связано, главным образом, с различием механизмов иницирования свободных радикалов и влиянием компонент сыворотки крови на процесс иницирования. Сильней это влияние проявляется в модели «Hb-H₂O₂-люминол». Расхождение результатов измерений более выражено у пациентов с аномально высоким содержанием в крови билирубина. В этой связи, более предпочтительной в клинической практике для оценки АОА следует считать модель окисления «АБАП-люминол».

Ключевые слова: антиокислительная активность, хемилюминесценция, свободнорадикальное окисление, люминол, сыворотка крови.

Для цитирования: Сажина Н.Н., Попов И.Н., Титов В.Н. Сравнение двух хемилюминесцентных моделей для оценки антиокислительной активности сыворотки крови больных с патологией печени. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(1): 16-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-16-21>

Sazhina N.N.¹, Popov I.N.², Titov V.N.³

THE COMPARISON OF TWO CHEMILUMINESCENT MODELS FOR ASSESSING ANTI-OXIDATIVE ACTIVITY OF BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH LIVER PATHOLOGY

¹The Federal state budget institution of science "The N.M. Emanuel institute of biochemical physics" of the Russian academy of sciences, 119334 Moscow, Russia

²The research institute of anti-oxidation therapy, Berlin, Germany

³The Federal state budget scientific institution "The Russian cardiologic R&D production complex" of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia

The comparative assessment was carried out concerning anti-oxidation activity of blood serum of patients with liver pathology using two chemiluminescent techniques with different models of free radical oxidation: «Hb-H₂O₂-luminol» и «ABAP-luminol». The reliable but low correlation of results was established ($r=0,798$) related mainly to difference in mechanisms of initiation of free radicals and effect of blood serum on initiation process. This effect is stronger manifested in model «Hb-H₂O₂-luminol». The discrepancy of results of measurement is more expressed in patients with anomalous higher content of bilirubin in blood. Thereupon, oxidation model «ABAP-luminol» is to be considered as a more preferable for clinical practice.

Key words: anti-oxidant activity; chemiluminescence; free radical oxidation; luminol; blood serum.

For citation: Sazhina N.N., Popov I.N., Titov V.N. The comparison of two chemiluminescent models for assessing anti-oxidative activity of blood serum of patients with liver pathology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63 (1): 16-21. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-16-21>

For correspondence: Sazhina N.N., candidate of physical mathematical sciences, senior researcher of the Federal state budget institution of science "The N.M. Emanuel institute of biochemical physics". e-mail: Natnik48s@yandex.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.02.2017

Accepted 20.02.2017

Введение. Определение антиокислительной активности (АОА) сыворотки крови человека является важной задачей для медико-биологических исследований, поскольку АОА определяет защитную систему организма для борьбы с окислительным стрессом, как результатом нарушения равновесия между образующимися свободными радикалами и соответствующими защитными механизмами в организме. Сыворотка крови представ-

ляется сложной субстанцией для исследований, АО состав которой обусловлен, прежде всего, наличием в ней аминокислот, мочевой кислоты, витаминов Е, А, С, гормонов, ферментов, а также промежуточных и конечных продуктов метаболизма [1]. При этом суммарная АОА есть некая интегральная величина, характеризующая потенциальную возможность АО действия всех компонент сыворотки крови с учетом их потенциального синергизма. Печень - один из главных органов в антиокислительной системе организма, поэтому изучение АОА сыворотки крови больных с патологией печени является важным аспектом понимания *in vivo*

Для корреспонденции: Сажина Наталья Николаевна, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. ФГБУ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; e-mail: Natnik48s@yandex.ru

окислительных превращений. На протяжении многих лет предпринимаются попытки создания методик для определения суммарной АОА одновременно всех, присутствующих в плазме крови, ингибиторов свободно-радикальных реакций, однако роль каждого из АО может существенно отличаться при различных способах активации окислительных процессов. Поэтому выбор адекватных систем оценки АОА имеет первостепенное значение для правильной интерпретации полученных результатов в рамках клинической лабораторной диагностики. Определение АОА предполагает не только обнаружение одного или нескольких веществ, а выявление их «функциональной» АОА, что может быть воспроизведено в подходящей окислительной системе. Основными компонентами любой тест-системы для определения АОА являются: система генерации радикалов и субстрат или молекула-мишень, которая подвергаясь окислению, меняет свои регистрируемые физико-химические свойства. От выбора этих объектов и зависит информативность полученных результатов. В настоящее время всё большее распространение получают хемиллюминесцентные (ХЛ) методы определения АОА сыворотки крови и других биологических жидкостей [1]. Они достаточно чувствительны, оперативны и позволяют непосредственно контролировать кинетику окисления. Одним из главных различий ХЛ методов является способ генерации свободных радикалов. Он может осуществляться по разным принципам: химическому (например, в ферментативной реакции ксантинооксидаз, при взаимодействии гемсодержащих производных с перекисью водорода) или физико-химическому (при термоинициированном распаде азо-соединений, облучении фотосенсибилизаторов).

Цель настоящей работы - сравнительный анализ определения суммарной АОА сыворотки крови пациентов с патологией печени, проведенный на двух хемиллюминесцентных приборах с различными моделями свободнорадикального окисления.

Материал и методы. Пробы сыворотки крови 26 больных с патологией печени (атрофический цирроз, новообразования и др.) и 8 доноров с необходимыми клиническими показателями крови были предоставлены для исследования Институтом клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова Российского кардиологического научно-производственного комплекса. Измерения суммарной АОА параллельно на двух ХЛ приборах были выполнены в ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН.

В первой модели свободнорадикального окисления использовалась система «гемоглобин (Hb)—(H₂O₂)—люминол», в которой образование радикалов-инициаторов происходит при взаимодействии Hb и H₂O₂, а люминол играет роль хемиллюминогенного субстрата окисления. Эта модель, хотя и не до конца изучена, представляет интерес своей «физиологичностью», поскольку взаимодействие Hb и H₂O₂ может происходить *in vivo*. Подробная методика использования этой модели для изучения АОА сыворотки крови и ее отдельных компонентов изложена в [2]. Кинетика и конкретная схема протекающих при взаимодействии Hb и H₂O₂ реакций очень сложные. Авторами [3] было обнаружено, что в результате реакции оксиHb с H₂O₂ происходит быстрое образование метHb (Hb-Fe³⁺). Взаимодействие метHb с избытком H₂O₂ ([гем]:[H₂O₂] = 1:10, моль:моль) сопровождается разрушением гема и освобождением ионов железа, которые реагируют с H₂O₂, образуя реактив-

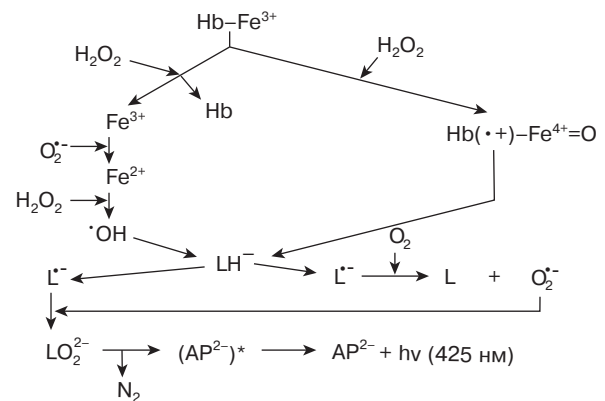
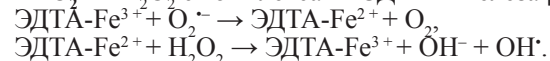


Рис. 1. Предполагаемая схема реакций в системе «Hb—H₂O₂—люминол», приводящих к генерации квантов ХЛ (пояснения в тексте).

ную форму, окисляющую деоксирибозу. Поскольку это окисление ингибируется хелаторами ионов железа и перехватчиками ОН[•]-радикала, был сделан вывод, что он и является этой реактивной формой [3, 4]. Однако при взаимодействии оксиHb и метHb с эквимольными концентрациями H₂O₂ ([гем]:[H₂O₂] = 1:1) разрушения гема не наблюдается, а происходит образование другой реактивной частицы, которая также окисляет деоксирибозу, но ее окислительная деградация меньше ингибируется перехватчиками ОН[•], но более чувствительна к таким ингибиторам, как 4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота. Этой частицей является радикал феррил Hb (Hb(•⁺)-Fe⁴⁺=O) [5, 6], обладающий высокой реакционной способностью [7, 8]. Добавление в реакцию вместо Hb солей двухвалентного (FeSO₄) и трехвалентного железа (FeCl₃) не дает свечения [2], что указывает на необходимость наличия гемовой структуры у радикалов-инициаторов. В методике [2] для предотвращения разложения H₂O₂ металлами переменной валентности, присутствующими в следовых количествах в воде и химических реактивах, в состав буфера добавляли 100 мкМ ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). Обнаруженная при этом способность церулоплазмينا и трансферрина уменьшать интенсивность ХЛ системы «Hb—H₂O₂—люминол», обусловлена антирадикальными свойствами этих белков [9], а не их ферроксидазной (церулоплазмин) или хелатирующей (трансферрин) активностью [9]. Наиболее вероятными инициаторами окислительных превращений люминола в рассматриваемой модельной системе являются радикалы феррилHb. Однако это не исключает участия в них и ОН[•], который может также образоваться при взаимодействии O₂^{•-} и H₂O₂ с комплексами ЭДТА и железа [10]:



На рис. 1 приведена предполагаемая схема реакций, приводящих к образованию радикалов-инициаторов окисления люминола [11]. Взаимодействие H₂O₂ с метHb, с одной стороны, сопровождается разрушением гема и выходом из него ионов железа, участвующего в образовании ОН[•], а, с другой стороны, приводит к возникновению радикалов феррилHb (Hb(•⁺)-Fe⁴⁺=O). Указанные радикалы-инициаторы вызывают одноэлектронное окисление люминола, в процессе которого образуется L^{•-}-радикал, O₂^{•-}-радикал, эндопероксид люми-

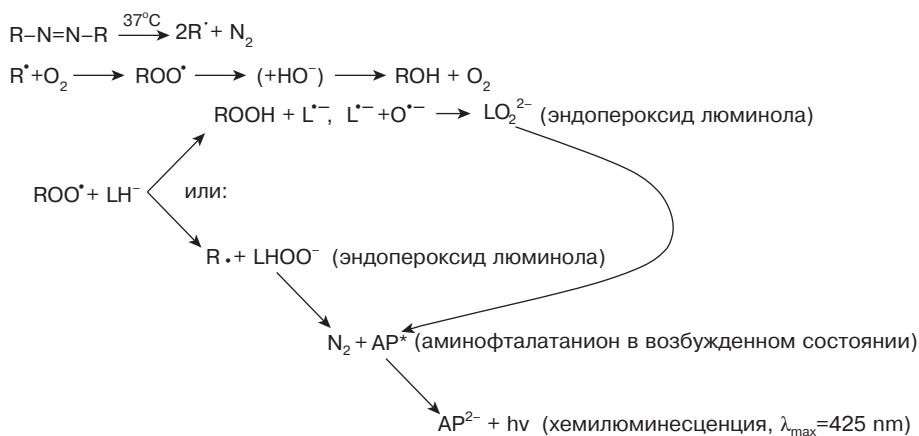


Рис. 2. Схема предполагаемых реакций в модели «АБАП-люминол».

нола LO_2^{2-} и 3-аминофталат дианион в возбужденном состоянии (AP^{2-})*, при переходе которого в основное состояние высвечивается квант света $h\nu$ (425 нм). Преимуществом этой модели, помимо «физиологичности», является доступность и не токсичность используемых реактивов, недостатком - нестабильность H_2O_2 и необходимость контроля ее концентрации.

ХЛ этой модельной системы регистрировали на приборе «Lum-5773»; www.chemilum.ru по методике [2].

Во второй модели (термо-ХЛ) субстратом окисления тоже служит люминол, а инициирование свободных радикалов происходит при термическом распаде водорастворимого азо-соединения 2.2'-азо-бис (2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП). Возникшие радикалы детектируются в реакции с люминолом (LH^-), сопровождающейся ХЛ. На рис. 2 приведена соответствующая схема реакций [12].

Эндпероксид люминола, образующийся в реакциях, существует в двух формах, одна из которых трансформируется в LH^- и O_2 без излучения (верхняя реакция на рис. 3 [13]), в то время, как другая форма, после промежуточных превращений, теряя азот, переходит в молекулу 3-аминофталат дианиона в возбужденном состоянии (AP^{2-})*, в результате чего испускается квант света (нижняя реакция на рис. 3 [14]). Скорости этих реакций примерно одинаковы, но точный механизм второй реакции не ясен [14]. В работе [12] установлено, что в ней должен участвовать супероксид $O_2^{\cdot-}$, поскольку суперокси-

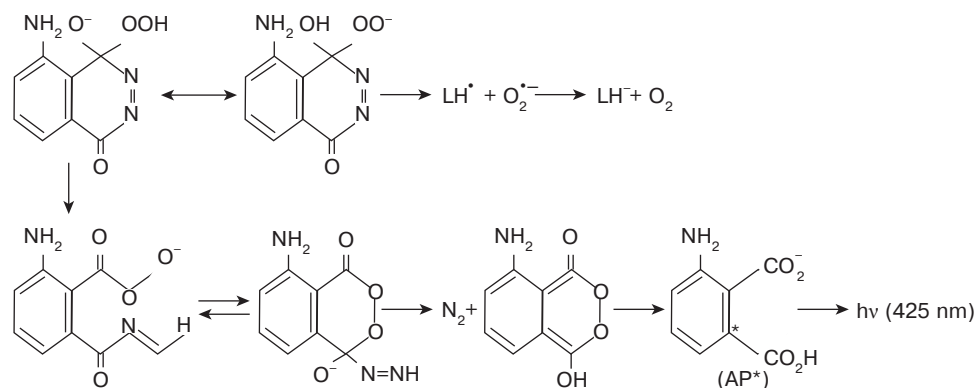


Рис. 3. Реакции превращения эндпероксида люминола.

дисмутаза (СОД) тушит хемилюминесценцию.

Количество пероксидных радикалов, образующихся при термическом распаде АБАП равно: $N = R_i \cdot t = k[АБАП]t$, где R_i — скорость генерации радикалов, k — константа скорости, t — продолжительность реакции [15]. В водной среде с $pH = 7,4$ и температуре $37^\circ C$, R_i , (моль/л)/с = $1,36 \cdot 10^{-6} \cdot [АБАП]$. Для антиоксиданта с концентрацией $[АО]$ время ингибирования генерации пероксидных радикалов $t_{inh} = n[АО]/R_i$, где n — соответствующий стехиометрический коэффициент. Преимуществом модели термо-ХЛ (ТХЛ) является постоянство скорости инициирования радикалов при

стабильной температуре в течение длительного времени (период полураспада 175 часов). Регистрация ТХЛ осуществлялась на приборе minilum® при температуре ($37 \pm 0,01$)°C (www.minilum.de).

В обеих ХЛ системах основным измеряемым параметром при определении суммарной АОА водорастворимых компонентов плазмы крови (АСВ — «integral antiradical capacity of water soluble compounds») являлся латентный период. Он определялся как время от момента инициирования окисления до точки пересечения с временной осью касательной, приложенной к ХЛ кривой в точке её перегиба, соответствующей максимуму первой производной. Калибровка приборов проводилась по аскорбиновой кислоте (АК), и суммарная АОА водорастворимых субстратов (АСВ) выражалась в эквивалентном содержании АК в 1л сыворотки крови ($\mu mol/l$). Ошибка измерений этого параметра для первого прибора с учетом повторяемости результатов составила не более 15%, для второго не превышала 5%.

Результаты и обсуждение. На рис. 4 приведены кинетические ХЛ кривые, полученные при использовании обеих моделей окисления для проб пациентов: №1 — с самым низким значением АОА (АСВ), №2 — со средним, №3 — с самым высоким. Видно, что в первом случае (рис. 4, а) для разных проб характерно не только изменение латентного периода, но и значительное изменение интенсивности свечения, в то время как во второй модели (рис. 4, б) существенно изменяется только

латентный период. Особенно это характерно для больных с повышенным содержанием билирубина (проба №3). Для первой модели окисления особенно сильно выражено влияние белковых составляющих плазмы крови, которые, в основном, и подавляют амплитуду ХЛ [2].

На рис. 5 представлена корреляционная зависимость суммарной АОА (АСВ) водорастворимых компонентов сыворотки крови исследованных пациентов, полученная с по-

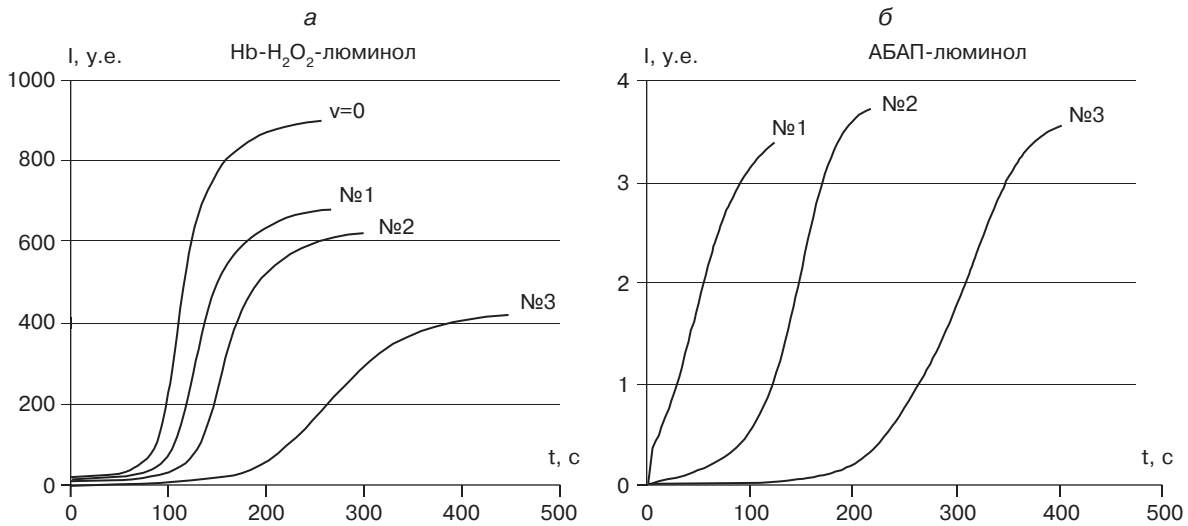


Рис. 4. Интенсивность ХЛ-свечения от времени для модели «Hb—H₂O₂—люминол» (а) и модели «АБАП—люминол» (б). Объем сыворотки крови $v = 2$ мкл (№1), 1,5 мкл (№2, 3) для (а) и $v = 2$ мкл (№1, 2, 3) для (б). №1 — проба с самым низким значением АСВ, полученная от донора, №2 и №3 — пробы реципиентов со средним и с самым высоким АСВ.

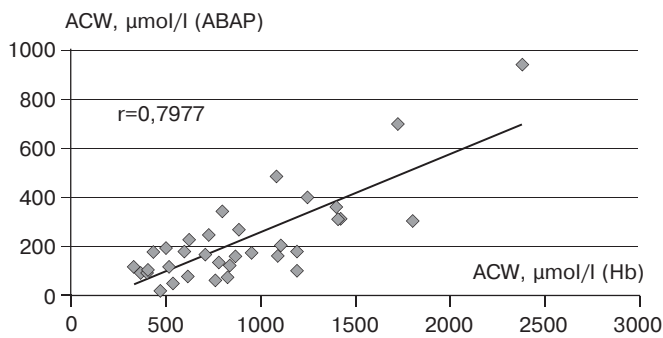


Рис. 5. Корреляция результатов измерений суммарной АОА сыворотки крови всех пациентов (АСВ — «integral antiradical capacity of water soluble compounds») для модели окисления с гемоглобином (АСВ, $\mu\text{mol/l}$ (Hb)) и с АБАП (АСВ, $\mu\text{mol/l}$ (АВАР)).

мощью обоих методов. Результаты демонстрируют большой разброс значений АСВ: от 300 до 2400 $\mu\text{mol/l}$ для первой модели, и от 15 до 940 $\mu\text{mol/l}$ для второй. Аномально высокие значения АСВ наблюдались у больных с повышенным содержанием в сыворотке общего билирубина (до 600 $\mu\text{mol/l}$ и выше, при норме 1,7—20,5 $\mu\text{mol/l}$). Корреляционный коэффициент для использованных моделей составил $r = 0,7977$. Относительно низкая корреляция связана, главным образом, с различием механизмов иницирования свободных радикалов и возможностью влияния некоторых компонентов сыворотки крови (особенно белковых) на скорость иницирования, что может значительно изменить наблюдаемый латентный период. Особенно это касается первой модели, в которой одним из радикалов-инициаторов является очень активный OH^\cdot -радикал, реагирующий со многими составляющими сыворотки

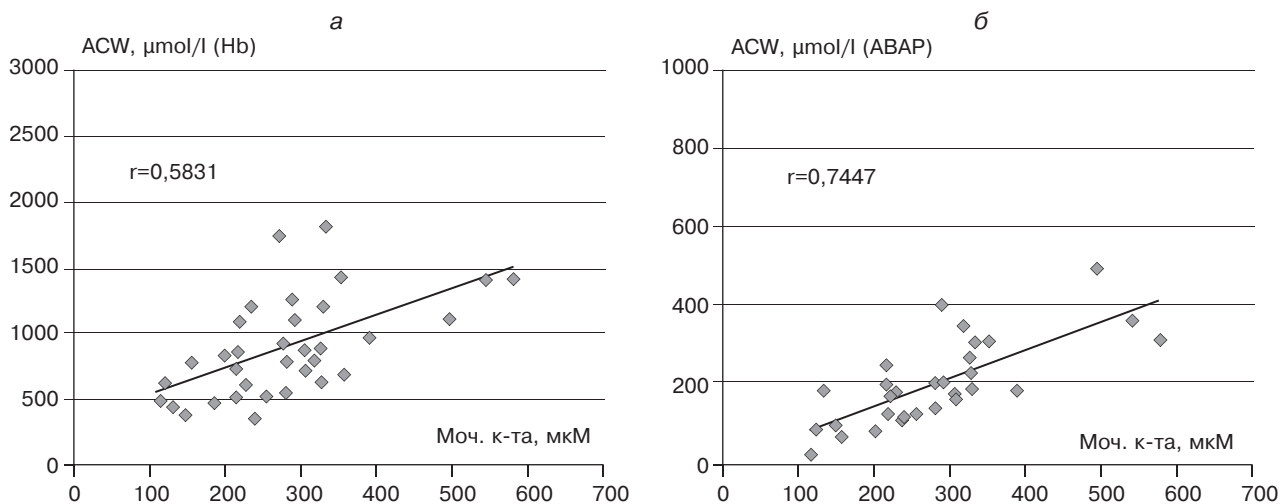


Рис. 6. Зависимости суммарной АОА (АСВ) сыворотки крови доноров и больных с патологией печени от содержания мочевой кислоты для модели окисления с Hb (а) и с АВАР (б). АСВ в $\mu\text{mol/l}$ АК.

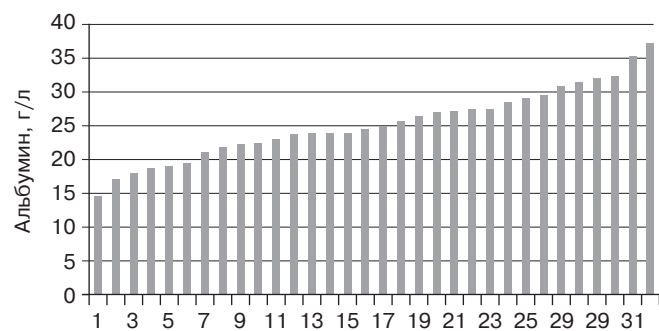


Рис. 7. Содержание альбумина в исследованных пробах сыворотки крови (биохимический анализ).

крови, в особенности с протеинами, которые «отвлекают» его от реакции с люминолом.

Подобные аргументы можно привести и для объяснения различий для двух моделей зависимостей АСВ от содержания в сыворотке крови мочевой кислоты (биохимический анализ) (рис. 6). Эквивалентное количество АК, определяемое латентным периодом при одном и том же количестве мочевой кислоты, в 3—4 раза больше в первой модели, чем во второй. Взаимодействуя с различными радикальными интермедиатами, мочевая кислота влияет в первой модели не только на латентный период, но в значительной степени и на интенсивность ХЛ. Корреляция АСВ с содержанием мочевой кислоты значительно хуже для первой модели ($r = 0,5831$), чем для второй ($r = 0,7447$). Значения подобных корреляционных коэффициентов, определенные с мочевой кислотой на модели с АБАП в других работах [16, 17], достаточно близки к коэффициентам, полученным в настоящих экспериментах. В [12, 18] на основании измерений плазмы крови 45 доноров показано, что АОА мочевой кислоты составляет 64% от общей АСВ, а белков — 5% (www.minilum.de).

Было показано, что в системах фотосенсибилизированной и термоиницированной ХЛ нативные аминокислоты и альбумин не обладают антирадикальной активностью, но приобретают её в процессе окислительной модификации [18]. В системе «Нб-Н₂O₂-люминол» на их долю приходится около 50% АСВ [2, 11]. Поэтому результаты измерений подвержены влиянию содержания альбумина в сыворотке, которое у печёночных больных занижено из-за нарушения синтезирующей способности печени (рис. 7). Среднее значение альбумина составило $25,21 \pm 5,33$ г/л (min = 14,4 г/л, max = 37,1 г/л) при норме 34—48 г/л. Как видно из диаграммы, разница значений альбумина у разных пациентов достигает 100% и выше, что является существенной помехой при определении параметра АСВ и ставит под сомнение его информативность. Единственной возможностью использовать метод «Нб-Н₂O₂-люминол» в клинических целях, по-видимому, является депротеинизация сыворотки крови. Однако при этом теряется возможность полной количественной оценки степени окислительного стресса, как это показано в системе ТХЛ путём сравнения антиокислительной защиты со степенью окислительного повреждения белков сыворотки крови [12].

Выводы. Таким образом, сравнительный анализ суммарной АОА водорастворимых компонентов сыворотки крови больных с патологией печени (АСВ), проведенный на разных моделях свободнорадикального окисления, показал значительное расхождение результатов из-

мерений и относительно низкую корреляцию ($r = 0,798$). Это связано, главным образом, с различием механизмов инициирования свободных радикалов и возможностью влияния некоторых компонентов сыворотки крови (особенно белковых) на процесс и скорость инициирования. Сильней это влияние проявляется в модели с «Нб-Н₂O₂-люминол», где одним из радикалов-инициаторов является активный ОН• радикал, который реагирует со многими составляющими сыворотки крови. Расхождение в результатах измерений заметнее для больных с аномально высоким содержанием некоторых компонентов сыворотки крови, которые по-разному ингибируют окисление люминола из-за побочных реакций. В этой связи, более предпочтительной для клинического применения с целью оценки АОА, как способности противостоять активным радикалам, следует считать модель окисления люминола с АБАП-инициатором.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 5—10, 12, 14—18 см. REFERENCES)

2. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичский О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.: Ингибирование сывороточными антиоксидантами окисления люминола в присутствии гемоглобина и пероксида водорода. *Вопросы медицинской химии*. 1997; 43(2): 87—93.
4. Якутова Э.Ш., Осипов А.Н., Костенко О.В. и др. Взаимодействие гипохлорита с оксигемоглобином приводит к освобождению железа в каталитически активной форме. *Биофизика*. 1992; 37(6): 1021—8.
11. Теселкин Ю.О. *Антиоксидантная активность сыворотки крови как критерий оценки функционального состояния антиоксидантной системы организма и эффективности применения экзогенных антиоксидантов*. Дисс. д-ра биол. наук. М.; 2003.
13. Русин Б.А. *Хемилюминесценция фталгидразидов*. Биохемилуминесценция. Труды московского общества испытателей природы. М.: Наука; 1983.

REFERENCES

1. Bartosz G. Total antioxidant capacity. *Adv. Clin. Chem.* 2003; 37: 219—92.
2. Teselkin Yu.O., Babenkova I.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov Yu.A. Inhibition by serum antioxidants oxidation of luminol in the presence of hydrogen peroxide and hemoglobin. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1997; 43(2): 87—93. (in Russian)
3. Puppo A., Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem. J.* 1988; 249(1): 185—90.
4. Yakutova E.Sh., Osipov A.N., Kostenko O.V. Interaction of hypochlorite with oxyhemoglobin leads to release of iron in catalytically active form. *Biofizika*. 1992; 37(6): 1021—8. (in Russian)
5. Giulivi C., Davies K.J. A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(32): 19453—60.
6. Lissi E.A., Escobar J., Pascual C. Visible chemiluminescence associated with the reaction between methemoglobin or oxyhemoglobin with hydrogen peroxide. *Photochem. Photobiol.* 1994; 60(5): 405—11.
7. Everse J., Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22(6): 1075—99.
8. Yamana T., Volkmer, Grishan M.B. The effects of sulfasalazine metabolites on hemoglobin-catalyzed lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 10(1): 41—9.
9. Wayner D.D.M., Burton G.W., Ingold K.U., Locke S.J. *FEBS Lett.* 1985; 187(1): 33.
10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press. 1985; 1—332.

11. Teselkin Yu.O. *The antioxidant activity of blood serum as a criterion for evaluating the functional state of the antioxidant system and the efficacy of exogenous antioxidants. [Antioksidantnaya aktivnost' syvorotki krovi kak kriteriy otsenki funktsional'nogo sostoyaniya antioksidantnoy sistemy organizma i effektivnost' primeneniya ekzogennykh antioksidantov]*. Diss. Moscow; 2003. (in Russian)
12. Popov I., Lewin G., eds. *Antioxidative homeostasis, its evaluation by means of chemiluminescent methods in oxidative stress assessment*. Transworld Research Network. Kerala, 2008, 361—91.
13. Rusin B.A. *Chemiluminescence ftalgidrazidov. Biohemilyumi-cence. Proceedings of the Moscow Society of Naturalists. [Hemiluminestsentsiya ftalgidrazidov. Biohemiluminestsentsiya. Trudy moskovskogo obshchestva ishytateley prirody]*. Moscow: Nauka; 1983. (in Russian)
14. Merenyi G., Lind J., Eriksen T.E. Nucleophilic addition to diazaquinones. Formation and breakdown of tetrahedral intermediates in relation to luminol chemiluminescence. *J. Amer. Chem. Soc.* 1986; 108: 1716—26.
15. Niki E. *Free Radical Initiators as Source of Water- or Lipid-Soluble Peroxyl Radicals. Methods in enzymology*. L. Packer & A.N. Glazer, eds. New-York: Academic Press; 1990.
16. Uotila J.T., Kirkkola A.L., Rorarius M. et al. The total peroxy radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and pre-eclamptic parturients. *Free Radic. Biol. Med.* 1994; 16(5): 581—90.
17. Lissi E.A., Salim-Hanna M., Pascual C., Castillo M.D. Evaluation of total antioxidant potencial (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18(2): 153—8.
18. Popov I., Lewin G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. VI. Antioxidant characteristics of human blood plasma, low density lipoprotein, serum albumin and aminoacids during *in vitro* oxidation. *Luminescence*. 1999; 14: 169—74.

Поступила 01.02.17
Принята к печати 20.02.17

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-092:612.112.3]-074

Потапенко В.Г.¹, Первакова М.Ю.², Лапин С.В.², Титов А.К.³, Суркова Е.А.², Петрова Н.Н.¹, Черноокая Н.Ю.¹, Миронова О.П.¹, Потихонова Н.А.⁴, Узденова Е.И.¹, Афанасьев Б.В.²

РОЛЬ ФРАКЦИОННОГО АНАЛИЗА ФЕРРИТИНА В ДИАГНОСТИКЕ ВТОРИЧНОГО ГЕМОФАГОЦИТАРНОГО СИНДРОМА

¹СПб ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31», 197110, Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

³ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург;

⁴ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА РФ, 191024, Санкт-Петербург

Вторичный гемофагоцитарный синдром (ВГФС) представляет собой жизнеугрожающее состояние, характеризующееся неспецифическими проявлениями: системной воспалительной реакцией, цитопениями, поражением печени и высоким содержанием ферритина в сыворотке крови. Одним из проявлений ВГФС является снижение уровня гликозилированного ферритина (ГФ) в сыворотке крови, выраженного в процентах от общего уровня. Определение ГФ может быть использовано для дифференциального диагноза с другими схожими по клинической картине критическими состояниями, прежде всего, с септическим процессом. Целью данного исследования было определение клинической ценности измерения ГФ для диагностики и дифференциальной диагностики ВГФС. Проанализированы образцы сыворотки крови и клинические данные пациентов с диагнозом ВГФС ($n = 40$), тяжелого сепсиса ($n = 24$), цитолитического синдрома ($n = 36$) и здоровых доноров ($n = 40$). Определено общее содержание ферритина турбидиметрическим методом («BioSystems», Испания) и рассчитан ГФ. Для определения уровня ГФ гликозилированную фракцию ферритина осаждали с помощью конканавалина А, полимеризованного с сепарозой 4В («GE Healthcare», США). Нормальные значения ГФ составили 78,3—87,1%. При ВГФС снижение содержания ГФ составило $25,0 \pm 18,4\%$ и было значительно ниже, чем при сепсисе — $47,0 \pm 17,7\%$ ($p < 0,001$) и цитолитическом синдроме — $63,5 \pm 18,7\%$ ($p < 0,001$). По результатам ROC-анализа площадь под кривой ГФ была наибольшей по сравнению с другими маркерами ВГФС, в частности, общим ферритином, триглицеридами, фибриногеном. При уменьшении уровня ГФ ниже 30,4% используемый нами метод обеспечивает клиническую чувствительность 69%, специфичность 94,3% и точность 86,9% в проведении дифференциального диагноза ВГФС. При расчете абсолютного содержания негликозилированного ферритина было обнаружено, что его значения коррелируют с концентрацией триглицеридов, международным нормализованным отношением, аспаратаминотрансферазой, аланинаминотрансферазой и общим билирубином у больных ВГФС ($p < 0,05$). Таким образом, снижение уровня ГФ позволяет с высокой точностью диагностировать ВГФС.

Ключевые слова: гемофагоцитарный синдром; сепсис; ферритин; гиперферритинемия; гликозилированный ферритин.

Для корреспонденции: Первакова Маргарита Юрьевна, врач КЛД клинико-диагностической лаборатории НМЦ молекулярной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава РФ; e-mail: margaritalerner@gmail.com