

Секция «Фундаментальная медицина»

Хемилюминесцентное определение стабильных метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека с помощью ферментативного сенсора

Болдырихин В.С.¹, Ибрагимова Л.Г.²

1 - Российский государственный медицинский университет, Медико-биологический факультет, 2 - Российский государственный медицинский университет,

Медико-биологический, Москва, Россия

E-mail: usbfromrstmu@rambler.ru

Хорошо известно, что при воспалении в сыворотке крови человека увеличивается количество нитритов и динитрозильных комплексов ионов железа (ДНКЖ) [3, 4]. Сегодня для измерения уровня нитритов в биологических жидкостях используется метод Грисса, обладающий невысокой точностью [2]. Таким образом, практика требует разработки метода, обеспечивающего линейность и воспроизводимость результатов в области более низких концентраций нитритов.

Целью предлагаемой работы была разработка и испытание в клинике хемилюминесцентного метода определения основных долгоживущих метаболитов оксида азота (нитритов и ДНКЖ) в сыворотке крови человека с использованием каталазы в качестве ферментативного сенсора.

В основе предлагаемого метода лежит явление ингибирования активности каталазы NO-группами молекул ДНКЖ и анионов нитритов в присутствии анионов хлора [4]. Для измерения концентрации нитритов была использована система, содержащая каталазу, пероксидазу хрена, перекись водорода и люминол. В этой системе каталаза и пероксидаза конкурируют между собой за перекись водорода. Но каталаза разлагает перекись водорода без сопутствующего свечения, а пероксидаза – со свечением. Поскольку в присутствии ионов нитрита активность каталазы снижается, на долю пероксидазы остаётся больше перекиси водорода. Пропорционально этому растёт и хемилюминесценция, т.к. вторым субстратом пероксидазной реакции выступает люминол, окисление которого сопровождается свечением.

Итак, если к системе, содержащей каталазу, пероксидазу, пероксид водорода и люминол добавить сыворотку крови, в которой содержатся ионы нитрита, то свечение должно увеличиться. Такие измерения и были проведены в нашей работе.

Первый этап работы состоял в построении калибровочной кривой зависимости светосуммы хемилюминесценции и скорости ее падения от концентрации нитрита. Первый этап показал, что наш метод позволяет измерять концентрации ионов нитрита вплоть до 50 нМ, что примерно в 4–5 раз точнее, чем при использовании традиционного метода Грисса.

На втором этапе проводились измерения концентрации нитрита в сыворотке крови у беременных женщин с преждевременным излитием околоплодных вод в результате субклинического течения инфекций [1]. Второй этап показал, что при преждевременном излитии околоплодных вод интенсивность свечения увеличивается по сравнению с контролем.

Таким образом, предлагаемый метод может быть рекомендован в качестве прогностического для измерения уровня основных долгоживущих метаболитов оксида азота в сыворотке крови пациента для скрининга субклинических воспалительных процессов.

Литература

1. Chadha S. et al. Nitric oxide metabolite levels in preterm labor // J Obstet Gynaecol Res. 2007 Oct;33(5):710-7.
2. Ghasemi A. et al. Preanalytical and analytical considerations for measuring nitric oxide metabolites in serum or plasma using the Griess method // Clin Lab. 2012;58(7-8):615-24.
3. Jaekle R.K. et al. Nitric oxide metabolites and preterm pregnancy complications // Am J Obstet Gynecol. 1994 Oct;171(4):1115-9.
4. Titov V. et al. Detection of nitrite and nitroso compounds in chemical systems and biological liquids by the calorimetric method // Biophysics, 2010, Vol. 55, No. 1, pp. 77-86.

Слова благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность А.Н. Осипову (д.б.н., профессор, зав. кафедрой общей и медицинской биофизики МБФ); В. Ю. Титову (д.б.н., вед.н.с. отдела медицинской биофизики); Ю.О. Тесёлкину (д.б.н., гл.н.с. отдела медицинской биофизики).