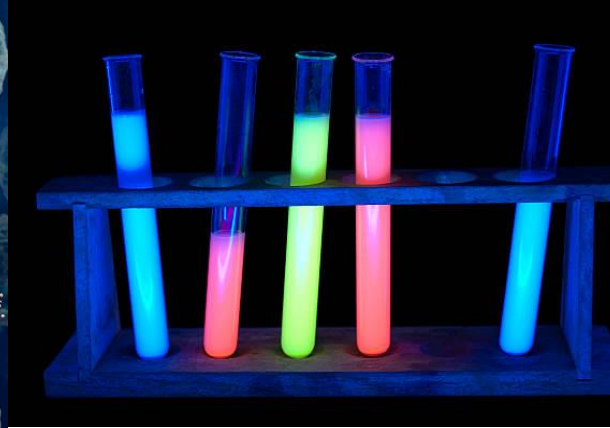
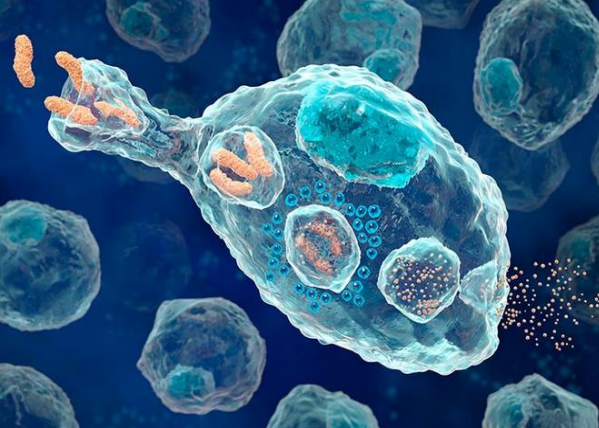
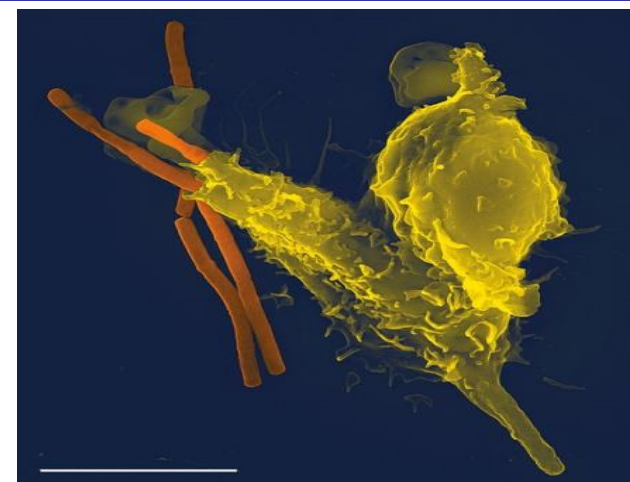
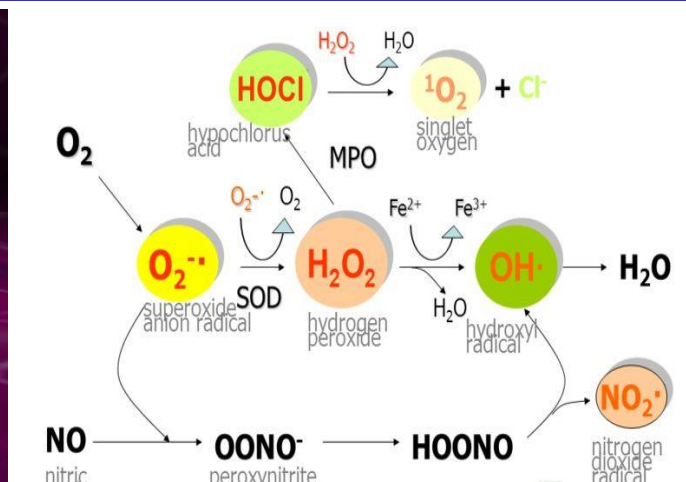
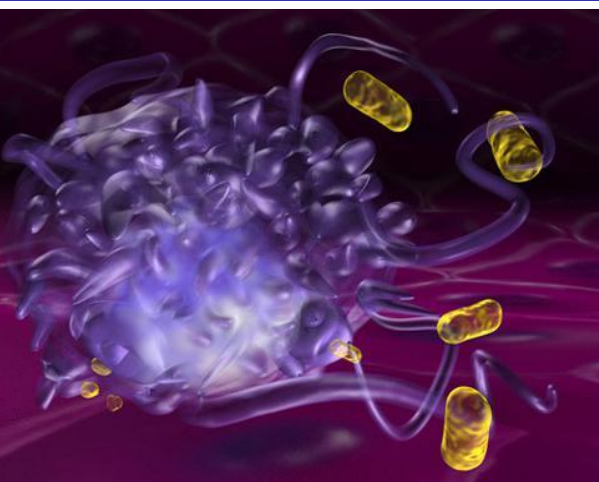




ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ



БИОЛЮМИНИСЦЕНЦИЯ – особая форма хемилюминисценции

Биологическая роль:

- привлечение добычи или партнёров
- коммуникация
- предупреждение или угроза
- отпугивание или отвлечение
- маскировка на фоне естественных источников света



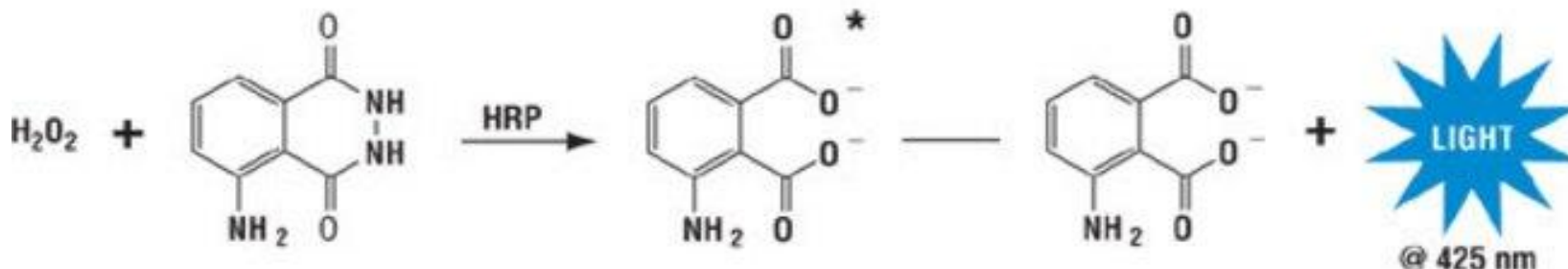
ХЕМИЛЮМИНСЦЕНТНЫЙ МЕТОД – это метод количественного (реже качественного) определения химических элементов и соединений, основанных на влиянии анализируемого вещества на интенсивность (спектр) хемилюминесценции (свечение, вызванное химическим воздействием).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Электрон отсоединяется от одного из участников реакции (восстановителя) и присоединяется к другому (окислителю), что приводит к запасанию в системе химической энергии, которая позже выделится в форме лучистой

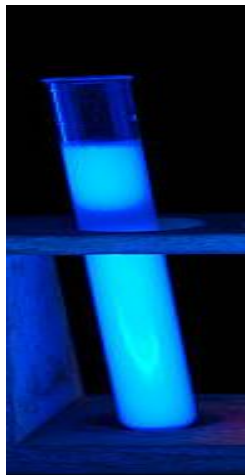
Перенос электрона на один из более высоких энергетических уровней, то есть переход продукта реакции в возбужденное состояние.

Переход продукта в основное состояние, сопровождающееся выделением энергии в виде кванта света (происходит собственно явление люминесценции).



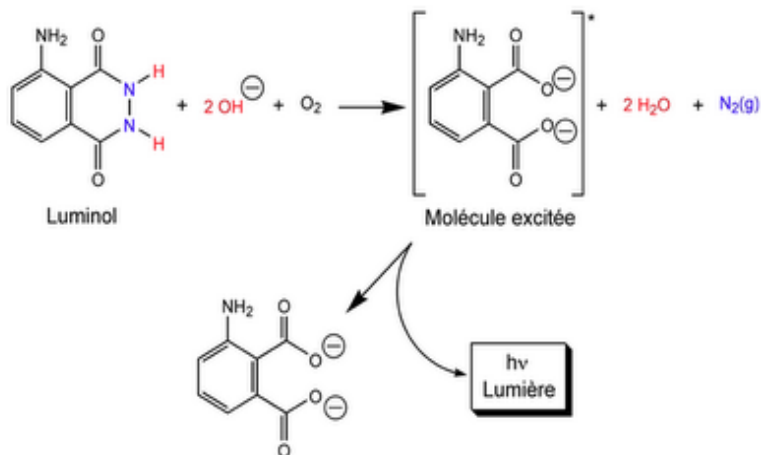
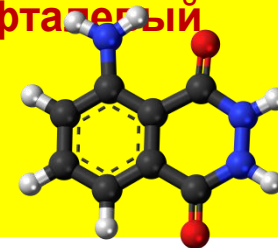


Естественная
хемилюминисценция
биологического
материал слабая



АКТИВАТОРЫ ХЕМИЛЮМИНИСЦЕНЦИИ:

- люминол (3-аминофталевый гидразид);
- люцигенин - бис-N-метилакридиний



Под действием окислителя (радикала гидроксила) происходит образование радикала люминола, который затем вступает в реакцию с супероксидным радикалом, образуя внутреннюю перекись (диоксид). Ее разложение приводит к образованию возбужденной молекулы 3-аминофталата. Переход этой молекулы в основное состояние сопровождается испусканием кванта света.

Где применять ХА?

- Скрининг биологически активных соединений.
- Подбор препаратов, влияющих на свободно-радикальное окисление.
- Прогнозирование эффективности действия антиоксидантов.

- Диспансеризация, диагностика скрытой патологии, состояния предболезни.
- Раннее выявление нарушений защитно-приспособительных реакций организма.
- Оценка активности патологического процесса.

ЛАБОРАТОРНО-ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СЛУЖБА

ФАРМАКОЛОГИЯ

ХЕМИЛЮМИНСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

БИОХИМИЯ

- Определение микроколичеств АТФ, НАДН и др.

ЭКОЛОГИЯ

- Раннее выявление негативного действия факторов среды.
- Оценка степени патогенности внешних воздействий.
- Биоэкологический мониторинг.

Применение метода

Изучение молекулярных основ физиологических процессов, исследование общих закономерностей и механизмов развития патологических состояний.

- Оценка защитно-приспособительных возможностей организма при различных воздействиях: промышленно-производственных, медикаментозных, экологических.
- Совершенствование и целенаправленный поиск эффективных способов диагностики, профилактики и лечения.

ФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, БИОФИЗИКА, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ДР.

Для чего применять ХА?

Назначение ХА



Хемилюминесцентный анализ используют для измерения содержания АТФ, и АТФ-азы, креатинкиназы, аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, миелопероксидазы, протеолитических ферментов, ферментов монооксигеназной системы печени и др.

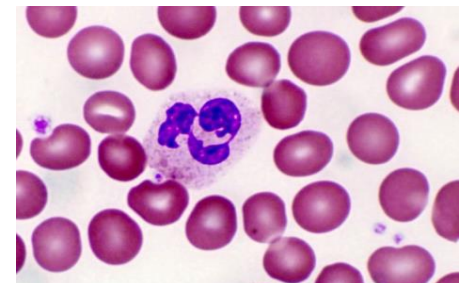
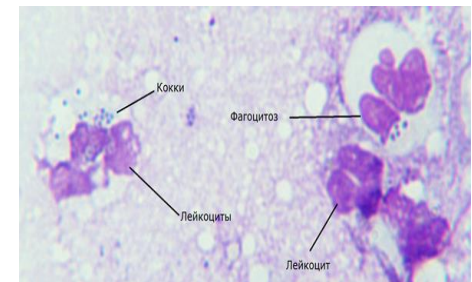
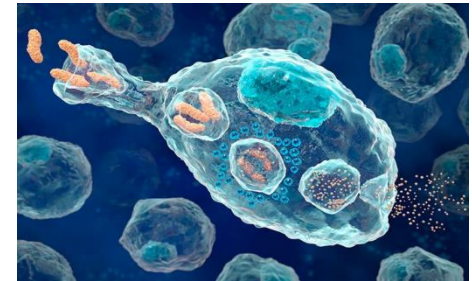
Метод эффективен для оценки функционального состояния фагоцитов периферической крови (гранулоцитов и моноцитов), его используют для прогнозирования тяжести заболевания и контроля эффективности терапии при воспалительных процессах.

Метод определения супермикроколичеств гемоглобина в крови.

ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ

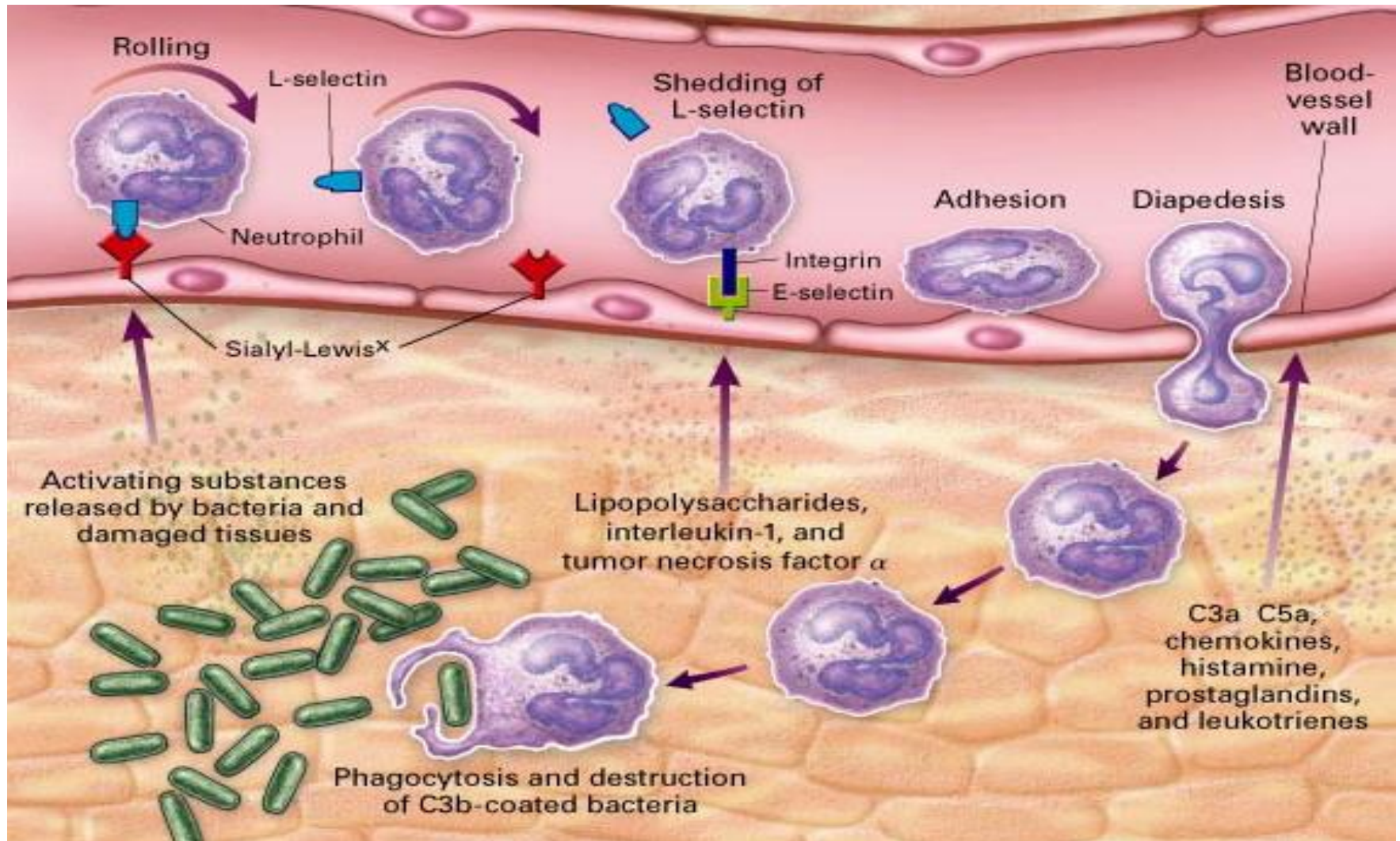
ФАГОЦИТОЗ — ПРОЦЕСС, ПРИ КОТОРОМ СПЕЦИАЛЬНО ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ЭТОГО КЛЕТКИ КРОВИ И ТКАНЕЙ ОРГАНИЗМА (ФАГОЦИТЫ) ЗАХВАТЫВАЮТ И ПЕРЕВАРИВАЮТ ТВЁРДЫЕ ЧАСТИЦЫ.

- Впервые ХЛ лейкоцитов при фагоцитозе была обнаружена в 1972 г. С этого времени ХЛ широко используется для исследования состояния лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и лимфоцитов.
- Уровень ХЛ при фагоцитозе характеризует интенсивность «респираторного взрыва» в клетках с продукцией активных форм кислорода, оказывающих бактерицидное действие.
- Механизм этого действия определяется деполяризацией мембранного потенциала при связывании рецепторов фагоцитов, повышением концентрации внутриклеточного кальция, изменением уровня кальмодулина с активацией фосфолипаз и НАДФН-оксидаз.
- При этом метаболизм арахидоновой кислоты ускоряется, повышается продукция простагландинов и лейкотриенов — регуляторов иммунного ответа, ингибирующих ХЛ в системе миелопероксидазы.

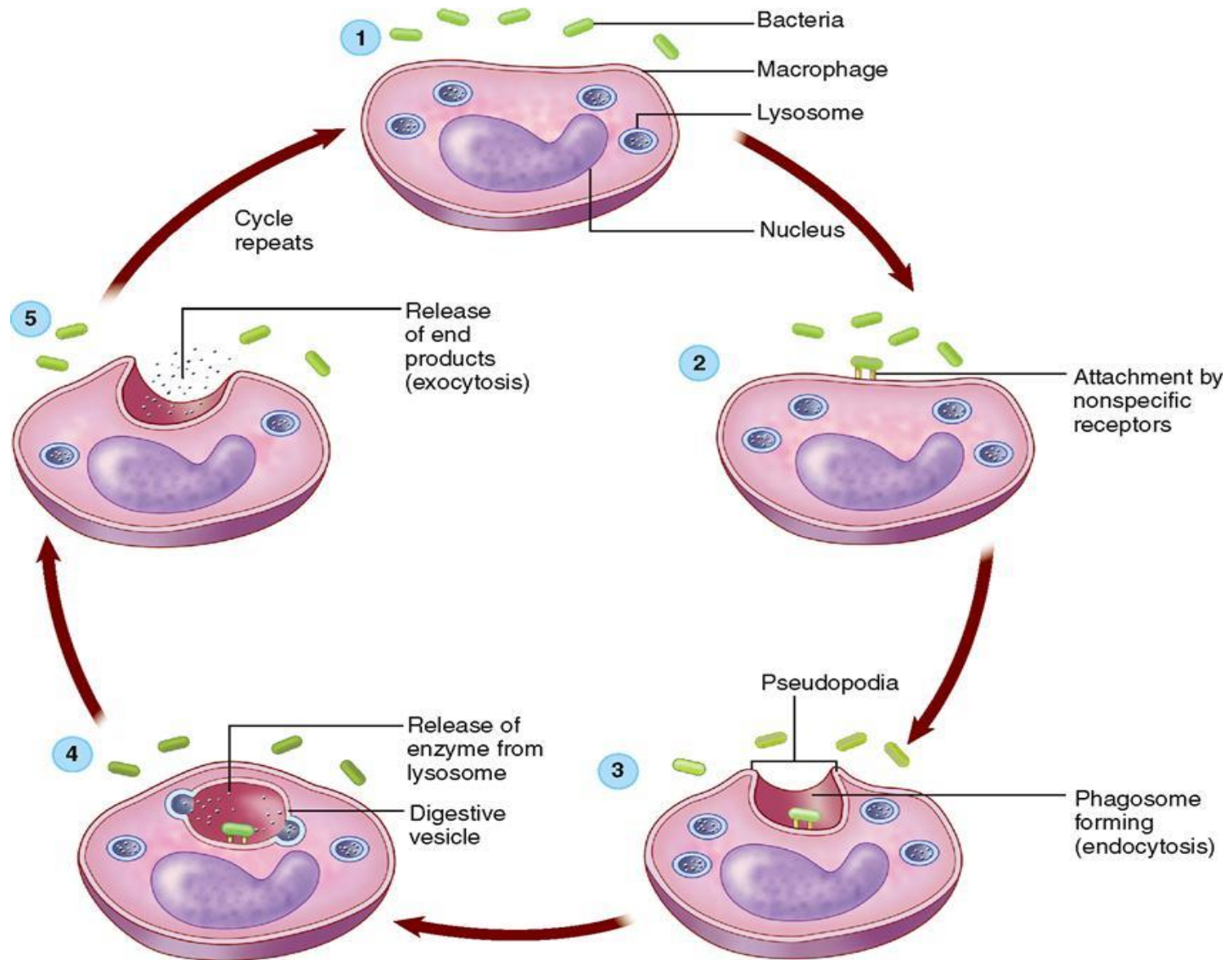


Стадии фагоцитоза:

1. – хемотаксис лейкоцитов



Стадии фагоцитоза:



Механизмы внутриклеточного киллинга (внутриклеточной цитотоксичности) фагоцитов

1. Кислороднезависимые механизмы (образование фаголизосомы и действие содержимого лизосом на фагосому)

Антимикробные пептиды



1. Лизоцим → расщепляет клеточную стенку (КС)
2. Катионные белки (дефензины, фагоцитин, и др.) → повреждают ЦПМ
3. Фосфолипаза A₂, C
4. Рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза
5. Лактоферрин → «отнимает» Fe
6. Low pH

2. Кислородзависимые механизмы («респираторный взрыв»)

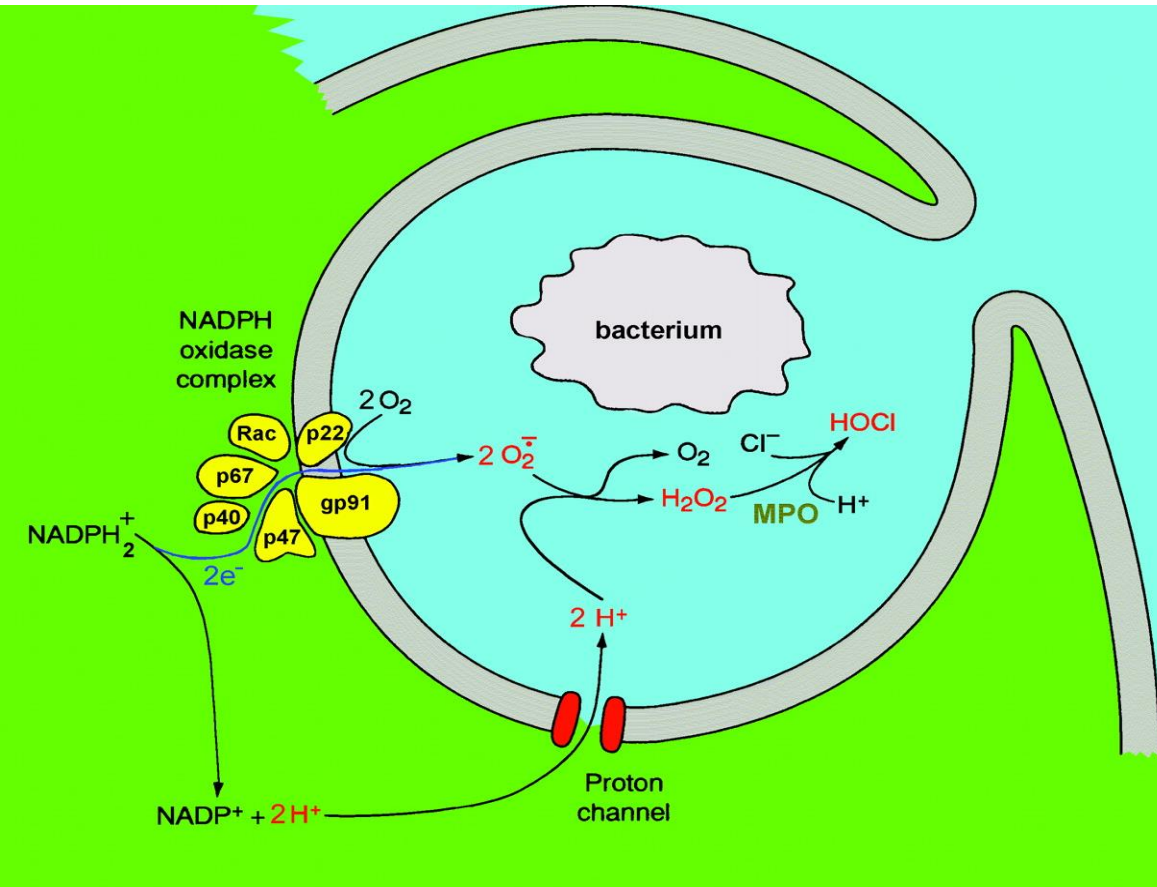


1. Супероксидный радикал
2. Перекись водорода
3. Гидроксильный радикал
4. NO, пероксинитрит
5. Синглетный кислород

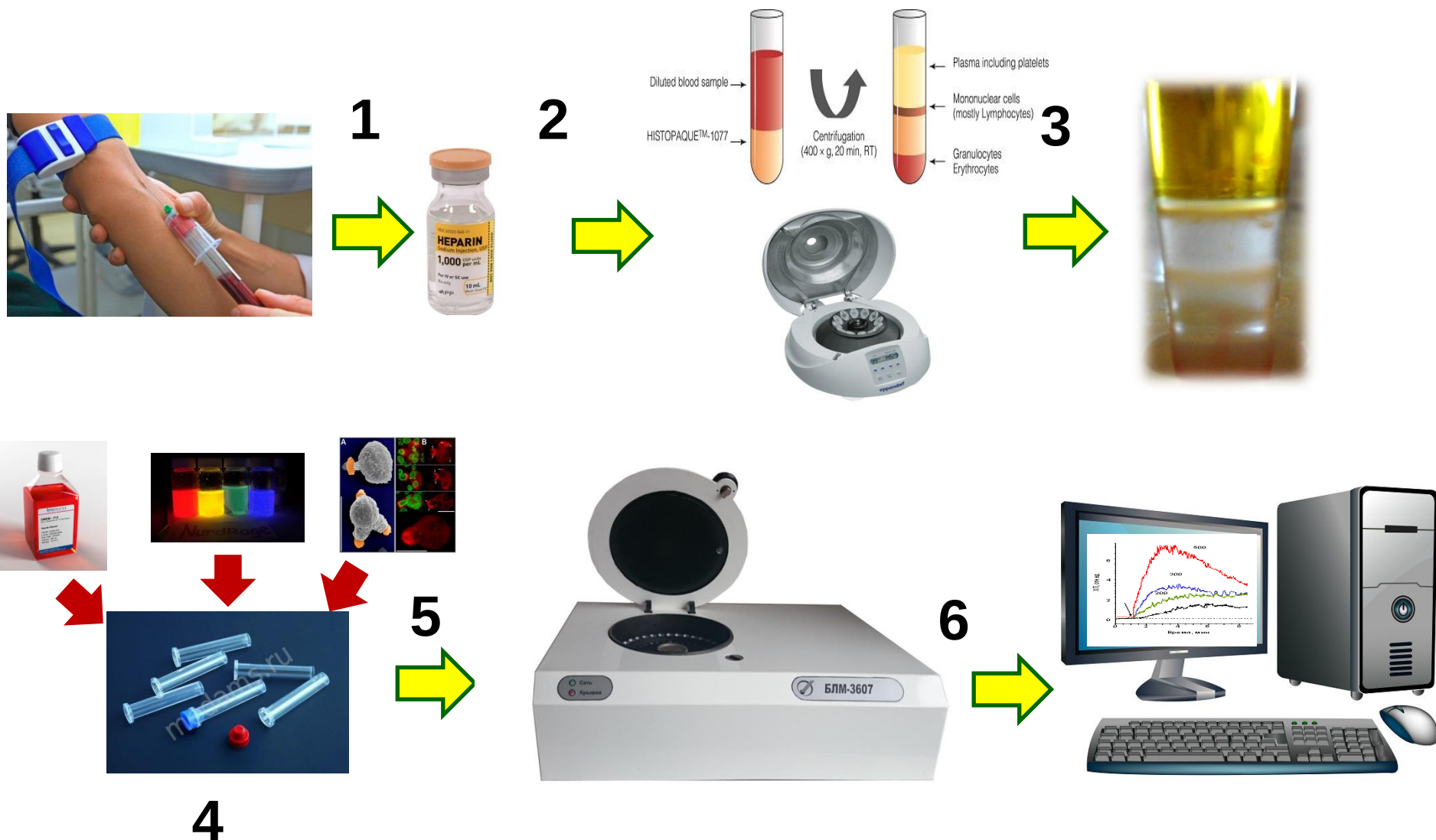


ПОЛ, ОМБ,
повреждение НК

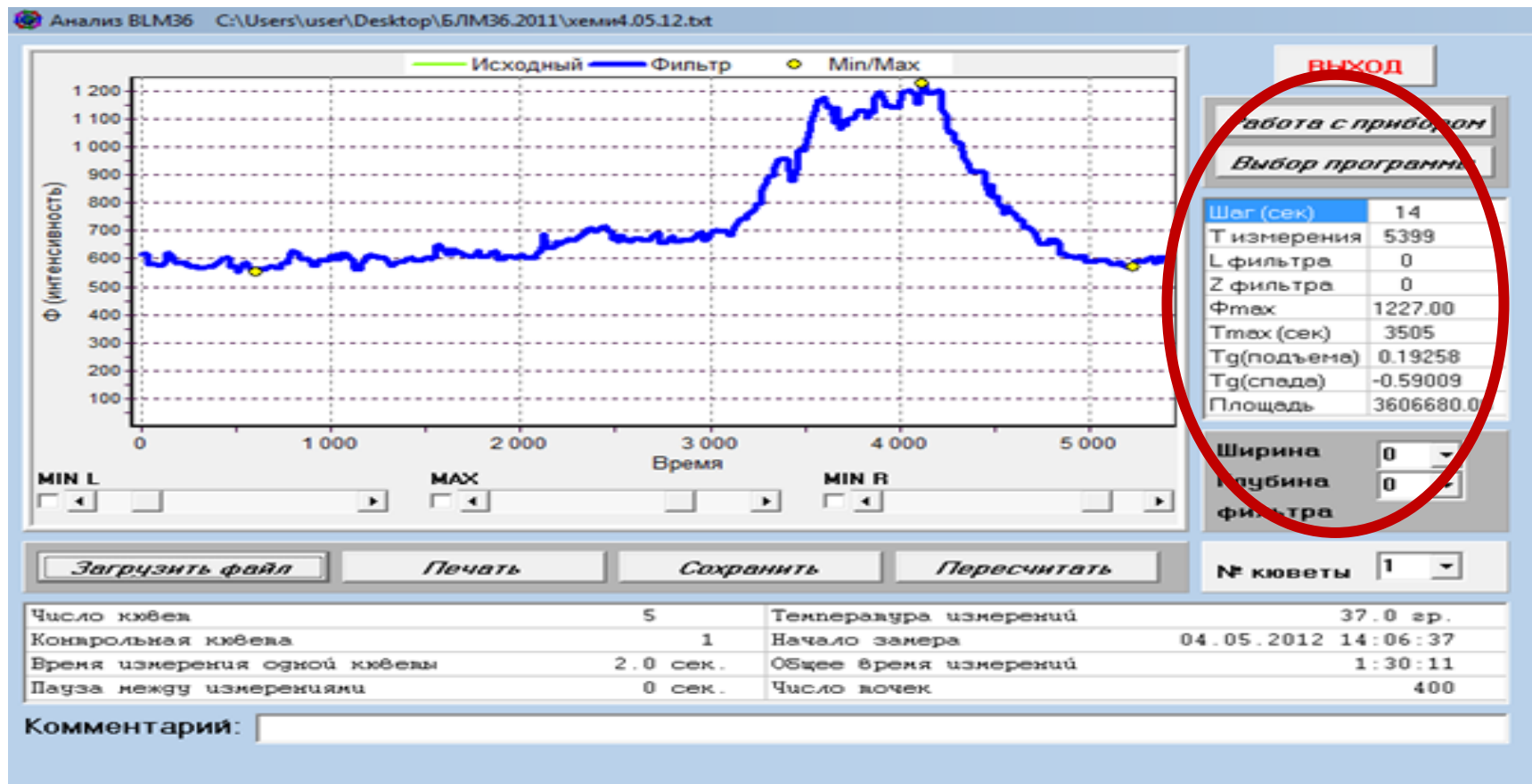
Внутриклеточный киллинг по механизму «респираторного взрыва» в фагоцитах



ПРОВЕДЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА (ХА)



ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ХА



- Порядок работы на приборе с помощью программы «HL2V2.5»
- Обработка полученных данных с помощью программы «BLM36_Obrab»

Примеры применения хемилюминисцентного анализа

Оценка влияния
физической нагрузки на
фагоцитоз нейтрофилов

Оценка иммунотропных
свойств настойки
колюрии
гавилатовидной

ПРИМЕРЫ

Оценка фагоцитарной
активности лейкоцитов
при аллергических
заболеваниях

Оценка состояния
активности ферментов
антиоксидантной
системы

Результаты оценки интенсивности окислительного взрыва в нейтрофилах у юношей и девушек 19-20 лет*

Показатели	Состояние покоя	Функц. проба	Уровень значимости, p
Спонтанная хемилюминесценция			
T max, сек	845,0 (0,0-2823,0)	237,0(53,0-687,0)	0,023
I max, о.е. ×10³	139,5(46,0-1227,0)	3701,5(1227,0-4859,0)	0,041
S, о.е. ×10⁵	133470,0(115500,0-152613,0)	3092921,0(2588414,0-6524141,0)	0,002
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция			
T max, сек	4823,5(4285,0-4945,0)	845,0(5,020-1743,0)	0,041
I max, о.е. ×10³	1336,0(214,0-1613,0)	9837,5(7049,0-13098,0)	0,041
S, о.е. ×10⁵	2830755,0(601152,0-4427544,0)	26454049,0(23230430,0-39792983,0)	0,041
S инд/ S сп	11,8396 (3,1256-36,8726)	8,3198(3,9514-9,9924)	0,003

*Саранчина Ю.В., Кеберле С.П. ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ХЕМИЛЮМИНИСЦЕНТНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. № 3. С. 417.

***Результаты оценки интенсивности окислительного взрыва в лейкоцитах мышей, которым вводили настойку колюрии гавилатовидной**

Показатели	Контрольная группа	к1	Уровень значимости, р
Спонтанная хемилюминисценция			
Т max, сек	164,0 (160,0-165,0)	199,0 (165,0-324,0)	0.13
I max, о.е. ×	3711,0 (3168,0 - 3953,0)	3140,0 (288,0 - 3702,0)	0.16
S, о.е. ×	339047,0 (311130,0-357709,0)	451574 (253656-931056)	0.25
Зимозан -индуцированная хемилюминисценция			
Т max, сек	173,0 (168,0-525,0)	562 (245-776)	1.00
I max, о.е. ×	3892,0 (3439,0-4043,0)	3785 (2661-4200)	0.25
S max, о.е. ×	565980 (348780-1562940)	1676581 (763812-2725344)	0.16
S инд/ S сп	1.58 (1.18-5.02)	2.14 (1.71-6.24)	0.25

*Бочарова И.А., Данилов Р.И., Дутова С.В. Влияние извлечения *Coluria geoides* (Rosaceae) на функциональную активность фагоцитов// Человек и лекарство. – 2016. – С.167

Показатели спонтанной и индуцированной хемилюминесценции лейкоцитов крови у детей 3-6 лет с атопическим дерматитом и респираторным аллергозом ($M \pm m$) *

Показатели	Здоровые N=24	Ат.дерматит N=35	Респ.аллергоз N=21
Спонтанная хемилюминесценция			
Tmax, (сек.)	2220,6±181,6	2065,2±142,6	1797,1±85,2 $P_1 < 0,05$
Imax, (о.е.×10³)	2,99±0,54	1,90±0,23 $P_1 < 0,05$	2,55±0,33 $0,1 > P_2 > 0,05$
S, (о.е. ×10⁵)	3,58±0,98	2,91±0,51	2,73±0,33
Хемилюминесценция, индуцированная зимозаном			
Tmax, (сек.)	2460,0±81,2	2212,6±74,5 $P_1 < 0,05$	2181,8±84,2 $P_1 < 0,05$
Imax, (о.е. ×10³)	11,51±1,73	4,96±0,69 $P_1 < 0,001$	6,71±1,00 $P_1 < 0,05$
S, (о.е. ×10⁵)	11,27±2,72	5,38±0,82 $P_1 < 0,05$	11,05±1,94 $P_1 < 0,01$
Sзим./Сспон.	3,94±0,70	2,70±0,29	2,93±0,33

*Применение хемилюминисцентного анализа для оценки функциональной активности лейкоцитов крови у детей с иммунопатологическими состояниями (Методические рекомендации) / сост.: А.А. Савченко, Л.М. Куртасова, Н.А. Шакина, А.Р. Шмидт. – Красноярск: Краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. – 1996 г. – 20 с.

**Показатели активности внутриклеточных ферментов лейкоцитов
крови у больных атрофическим гастритом и раком желудка,
ассоциированными с *Helicobacter pylori* ***

Показатели	Контрольная группа	Больные АХГ	Больные РЖ	Уровень статистической значимости, р
Глюкозо-6-фосфат – дегидрогеназа (Г6ФДГ), мкЕ	318,68±96,80	8346,54±2867,96	1259,41±745,77	P1 = 0,017 P2 = 0,026 P3=0,001
Глутатион-редуктаза (ГР), мкЕ	4,23±2,98	78,67±30,91	71,07±29,91	P1 = 0,05 P2 = 0,038 P3=0,005
Интерпретация результата		Повышение активности воспаления	Истощение метаболических ресурсов	

*Саранчина Ю.В., Штыгашева О.В., Агеева Е.С.
ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ
HELICOBACTER PYLORI-ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
/ Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2013. № 3. С. 41-44.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Спектр применения ХЛ широкий.
- ХЛ является перспективным методом лабораторной диагностики.
- ХЛ может быть использована как для диагностики донозоологических форм, постановки диагноза и так и как маркер эффективности проводимой терапии.

