

УДК 617.711-002.1-022

СПОСОБНОСТЬ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ГАСИТЬ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В ОСТРУЮ ФАЗУ АДЕНОВИРУСНОГО КЕРАТОКОНЬЮНКТИВИТА

Быкова Е.В., Сторожук Л.А., Хвостова Т.С.

ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар,
e-mail: corpus@ksma.ru

Описан люминол-хемилуминесцентный (л-ХЛ) метод определения способности слезной жидкости (СЖ) гасить активные формы кислорода (АФК), который использован при изучении этого свойства в СЖ у здоровых людей (контроль) и страдающих аденовирусным кератоконъюнктивитом (АВКК). Установлено, что у больных в острую фазу АВКК свойство СЖ гасить АФК (антирадикальной защиты) увеличивается более чем в два раза (+127%), которое отмечено на фоне повышенного слезотечения.

Ключевые слова: слезная жидкость, люминол-хемилуминесценция, активные формы кислорода, аденовирусный кератоконъюнктивит

THE ABILITY OF LACHRYMAL FLUID TO REDUCE THE ACTIVE FORMS OF OXYGEN IN THE ACUTE PHASE OF ADENOVIRAL KERATOCONJUNCTIVITIS

Bykova E.V., Storozhuk L.A., Khvostova T.S.

State Educational Institution of Higher Professional Education «Kuban State Medical University»
of Ministry of Public Health and Social Development of Russian Federation,
Krasnodar, e-mail: corpus@ksma.ru

The work depicts the luminol-chemiluminescent (L-CHL) method of estimation the ability of lachrymal fluid (LF) to reduce the active forms of oxygen (AFO) that was used in the analysis of this LF property among healthy people (control) and those who suffered from adenoviral keratoconjunctivitis (AVCC). It was found that the ability of LF to reduce AFO of those who suffered from AVCC increased more than two-fold (+127%) and it was observed on the background of epiphora (increased lacrimation).

Keywords: lacrymal fluid, luminol-chemiluminescence, active forms of oxygen, adenoviral keratoconjunctivitis

В офтальмологической практике для определения степени тяжести заболевания органов зрения и эффективности их терапии часто прибегают к различным биохимическим методам исследования слезной жидкости (СЖ). Среди них видное место занимает определение её способности гасить агрессивные формы кислорода (АФК) такие, как O_2 , O_2^- , $-OH$ и H_2O_2 , избыточно образующиеся при воспалительных заболеваниях, например, при аденовирусном кератоконъюнктивите (АВКК), офтальмогерпесе и др. Для этих целей используется люминол-хемилуминесценция в буферном растворе, индуцированная H_2O_2 , которая гасится компонентами антирадикальной защиты (АРЗ) биологической жидкости (белками, мочевой кислотой, билирубином и другими соединениями органической природы [1, 2, 4].

Для люминол-хемилуминесцентного (л-ХЛ) метода определения способности СЖ гасить АФК используется люминистор – ЛТ-01 при $\lambda = 335$ нм (Ростовского НИИ экспериментальной биологии), электронное устройство которого рассчитано на 10 условных единиц.

В настоящее время не существует унифицированного метода для определения способности гасить активные формы кислорода (ГАФК) в биологических жидкостях. Обычно л-ХЛ биологической жидкости

определяют в Трис-НС1 буфере, которую индуцируют раствором H_2O_2 . Объемы буферного раствора (содержащего люминол) и H_2O_2 подобраны таким образом, чтобы при их соединении максимальная вспышка л-ХЛ равнялась $10,0 \pm 0,2$ усл. ед., которая принимается за 100%. Поскольку этот тест является ценным показателем остроты заболевания и его ремиссии, на примере СЖ мы подробно описываем этот метод [3].

Материалы и метод исследования

В качестве объекта исследования служила слезная жидкость (СЖ), полученная у 15 здоровых взрослых людей обоего пола (контроль) и у 25 больных в острый период аденовирусного кератоконъюнктивита. СЖ собирали при помощи специальной пипетки со съемными наконечниками в полиэтиленовые эпиндорфы (на 2 мл), которую сразу же подвергали исследованию, а если не удавалось сделать анализ в день взятия пробы, то её хранили в замороженном виде в холодильнике при $T = 20^\circ C$.

Реактивы

1. Приготовление Трис-НС1 буфера рН 6,8, 0,1 М. Трис(гидроксиэтил) аминометан ($C_4H_{11}O_3N$) 6,06 г растворяют в 450 мл дистиллированной H_2O , добавляют 4,6 мл концентрированной НС1, подгоняют рН до 6,8 и доводят объем раствора до 500 мл. Если используется $C_4H_{11}O_3NHCl$, то берут 7,85 г /0,5 л H_2O .

2. Приготовление раствора люминола. Люминола 4,5 мг растворяют в 10 мл Трис-НС1 буфера с рН 6,8 в пробирке, помещенной в водяную баню при $T 70-80^\circ C$.

3. Приготовление 0,35 М раствора H_2O_2 . Пергидроля 4,2 мл растворяют H_2O в колбе на 100 мл и доводят до метки.

4. Приготовление рабочего раствора люминол-буферной смеси. 2 мл раствора люминола (по п. 2) растворяют в 100 мл буфера (по п. 1).

Ход анализа

1) в пробирку вносят 2,9 мл люминол-буферной смеси (по п.4);

2) туда же вносят 10 мкл слезной жидкости;

3) прогревают в водяном термостате 8 мин при $-35-37^\circ C$;

4) реакционную смесь переносят из пробирки в кювету (с толщиной слоя жидкости 10 мм);

5) кювету ставят в гнездо ЛТ-01;

6) через инжектор в кювету вносят 0,5 мл раствора H_2O_2 (по п. 3);

7) записывают результаты, высвечиваемые на табло прибора;

8) рассчитывают % гашения и количество единиц гасящих факторов.

Результаты исследования и их обсуждение

Поскольку СЖ можно получить ограниченное количество (не более 0,1–0,3 мл) и она обладает очень высокой активностью ГАФК, то мы её разводили в Трис-НС1 буфере с рН 6,8 (1:10), а в опыт вносили со 100 мкл раствора СЖ или 10 мкл натуральной СЖ.

После введения такого количества СЖ в люминол-буферный раствор и прогревания в термостате удалось установить, что в СЖ лиц контрольной группы не погашенных активных (агрессивных) форм кислорода было от 3,68 до 8,9 (в среднем $6,12 \pm 0,48$) усл. ед., по сравнению с холостой пробой ($10,02 \pm 0,05$ ед.), принимавшейся за 100%. В то время, как у больных в острый период аденовирусного кератоконъюнктивита эти показатели в СЖ колебались от 0,58,5 до 2,59 (в среднем было $1,18 \pm 0,12$) усл. ед. Для расчета активности показателя в единицах компонентов антирадикальной защиты (АРЗ) слезной жидкости, способных гасить л-ЛХ в описанных условиях, пользуются формулой:

$$X = (K - O) \cdot 100 \text{ усл. ед./мл,}$$

где X – АРЗ СЖ по способности гасить л-ЛХ; K – контроль (по холостой пробе = 10,0); O – опыт (количество усл.ед. непогашенной л-ЛХ); 100 – коэффициент пересчета усл. ед на 1 мл СЖ.

В качестве примера приводим расчеты антирадикальной защиты (количество погашенных усл.ед./мл) слезной жидкости X_1 – здоровых людей (контроль), и X_2 – больных в острую фазу АВКК.

$$X_1 = (10,0 - 6,12) \cdot 100 = 388 \text{ ед./мл (100\%);}$$

$$X_2 = (10,0 - 1,18) \cdot 100 = 882 \text{ ед./мл (227\%).}$$

Для сравнения данные X_1 мы взяли за 100%. Из этих расчетов видно, что у больных в острую фазу АВКК активность антирадикальной защиты СЖ увеличивается более чем в два раза (+127%). Кроме того, необходимо учесть, что если настоящее заболевание в острую фазу сопровождается повышенным слезотечением, то образование факторов АРЗ следует увеличить еще в несколько раз.

Итак, в связи с этим следует отметить, что аденовирус, поднимаясь из носоглотки по слезовыводящим путям вверх и вовлекая в патологический процесс слизистые оболочки мягких тканей глаза, индуцирует биосинтез факторов антирадикальной защиты СЖ, которые направлены на снижение количества избыточно образующихся агрессивных форм кислорода. Хотя активные формы кислорода также являются факторами защиты организма.

Список литературы

1. Биохимические методы исследования слезной жидкости при вирусном кератоконъюнктивите / Е.В. Быкова, Е.Е. Соголовская, Т.С. Хвостова, Л.А. Сторожук // Актуальные проблемы офтальмологии: Всероссийская науч. конф. молодых ученых: Сборник научных работ. – М., 2010. – С. 43–45.
2. Сторожук П.Г. Цыганков А.И. Состояние системы антирадикальной защиты крови у больных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы в до- и после операционном периодах // Вестник интенсивной терапии. – 2007. – №5. – С. 213–215.
3. Хемилюминисценция и нитраты ротовой жидкости при использовании конструкций, корректирующих прикус зубов / П.Г. Сторожук, В.А. Артамонов, М.В. Артамонов, И.А. Сторожук // Вестник интенсивной терапии. – 2005. – №5. – С. 237–239.
4. Состояние антиоксидантной системы крови у женщин в до- и послеродовом периодах и при кесаревом сечении / П.Г. Сторожук, Б.Г. Ермошенко, И.М. Быков, А.П. Сторожук, А.И. Лузум // Intern. J. on Immunorehabilitation. – 2002. – Том. 4, № 2. – С. 234–240.

Рецензенты:

Голубцов В.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии с курсом медицинской генетики ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Краснодар;

Каде А.Х., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической патологической физиологии ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Краснодар.

Работа поступила в редакцию 26.05.2011.