

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 617.764.1-008.1-073.537.9

©Коллектив авторов

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ

А.И. Грицук¹, Т.В. Сирота², Л.В. Дравица¹, Е.А. Крэддок¹

¹Гомельский государственный медицинский университет Министерства
здравоохранения Республики Беларусь, 246050, Гомель,
эл. почта: gritsuk@inbox.ru

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290,
Пушино, Московская область, РФ, ул. Институтская, 3; тел.: (4967)739170;
факс: (4967)330553; эл. почта: sirotatv@rambler.ru

Предложен способ оценки антиоксидантных свойств слёзной жидкости (СЖ), основанный на ее способности ингибировать/активировать скорость реакции автоокисления адреналина в щелочной среде, которая связана с генерацией супероксидных радикалов. Этот метод, разработанный для исследования антиоксидантной активности (АОА) крови и активности супероксиддисмутазы (Сирота, 1999), в настоящей работе впервые был использован для исследования антиоксидантных свойств СЖ.

Слёзная жидкость практически здоровых людей обладает выраженной антиоксидантной активностью (АОА). У людей с признаками ОРВИ обнаружено полное истощение антиоксидантных свойств СЖ и выявлена ее прооксидантная активность. В группе людей, принимавших поливитамины в профилактических дозах, отмечается достоверное увеличение АОА СЖ.

Предполагается дальнейшее использование предложенного метода в офтальмологии для диагностики, контроля эффективности лечения и прогноза глазных заболеваний.

Ключевые слова: слезная жидкость, автоокисление адреналина, супероксид, антиоксидантная активность, прооксидантная активность

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что в клетках постоянно протекают пероксидные реакции, интенсивность которых находится под строгим контролем системы антиоксидантной защиты (АОЗ). Нарушение баланса между процессами перекисного окисления и системой АОЗ с преобладанием пероксидных реакций является предпосылкой развития любого патологического процесса, происходящего в организме [1]. При развитии ряда заболеваний организма, как правило, изменяется биохимическое состояние биологических жидкостей организма (кровь, моча, спинномозговая жидкость и др.). Изменённый биохимический спектр отражает не только наличие патологического процесса, но и его природу и глубину поражения [2, 3].

При заболеваниях органа зрения основные биохимические изменения происходят непосредственно в средах глаза, причем камерная влага глаза наиболее адекватно отражает состояние метаболических процессов этого органа. Так, в процессе развития воспалительных и дистрофических заболеваний органа зрения происходит резкая активация пероксидных реакций, сопровождающаяся

накоплением в камерной влаге продуктов этих реакций [3, 4]. Однако взятие камерной влаги сопряжено с определенными трудностями и осуществляется только при хирургическом вмешательстве.

Наиболее доступным биологическим материалом в офтальмологии является слезная жидкость (СЖ), биохимические показатели которой используются для изучения локальных процессов происходящих в глазу [5-12]. В СЖ выявлено усиление процессов ПОЛ при таких заболеваниях как офтальмогерпес, травматический увеит, гемофтальм, старческая катаракта, атеросклеротическая хориоретинопатия [13], открытоугольная глаукома [14]. Для целенаправленной, эффективной и обоснованной терапии может быть полезен мониторинг активности пероксидных процессов протекающих непосредственно в тканях глаза. Удобным объектом для этой цели может быть СЖ.

В настоящей работе была исследована антиоксидантная активность (АОА) СЖ разных групп пациентов (с признаками ОРВИ, получавшие витамины и здоровые доноры) с помощью ранее разработанного для крови удобного быстрого и доступного метода оценки АОА [15-18] и впервые примененного в настоящем исследовании для СЖ. В предлагаемом методе использовалась реакция автоокисления адреналина в щелочной среде, которая, как известно, является супероксид-генерирующей и супероксид-детектирующей системой и позволяет определять анти- и прооксидантные свойства биологических материалов.

Измерение накопления окисленных продуктов адреналина (адренохрома) проводили при 347 нм в отличие от известного метода Misra и Fridovich [20], где продукты окисления адреналина определяют при 480 нм. Как было показано ранее [15-18], использование длины волны 347 нм значительно (на порядок) увеличивает чувствительность метода и позволяет сразу, после инициирования реакции добавкой низких концентраций адреналина, измерять содержание продуктов его окисления. Способность биологических материалов ингибировать эту реакцию, оценивается как антиоксидантная активность, а активация реакции в присутствии исследуемых материалов – как прооксидантная [17, 19].

Показано, что АОА СЖ отражает общее состояние организма и использованный способ оценки ее свойств можно рекомендовать для широкого применения в офтальмологии.

МЕТОДИКА. Нами обследовано 20 человек мужского пола в возрасте 19-21 год. Все обследованные были разделены на три группы. I группа - 8 человек - клинически здоровые; II группу составили 7 человек, имеющих на момент исследования некоторые признаки ОРВИ (острой респираторной вирусной инфекции) (насморк, боли в горле, слезотечение и др.); III группа состояла из 5 человек, принимавших на момент обследования поливитамины в профилактических дозах (препарат “Ревит” по 1 драже 3 раза в день, в течение 3 недель). СЖ забирали из конъюнктивального мешка при помощи микропипетки со съёмным наконечником, не касаясь конъюнктивы. Такой способ забора СЖ является предпочтительным, поскольку не вызывает микротравматизации конъюнктивы, что могло бы исказить результаты анализа [5, 7]. Стимуляцию секреции СЖ производили с помощью свежерезанного репчатого лука. При этом срез луковички держали в течение 3-5 секунд на расстоянии 10 см от глаз.

АОА СЖ оценивали по ее способности влиять на скорость реакции автоокисления адреналина в щелочной среде. Измерения проводили в тест-системе, описанной ранее [15, 16]. В измерительную кювету с 0,2 М карбонатным буфером, pH 10,55 (2 мл) вносили 0,1 мл 0,1% раствора адреналина гидрохлорида (0,26 мМ), перемешивали и начинали регистрацию реакции автоокисления адреналина при комнатной температуре (22°C) и длине волны 347 нм (контрольная проба). Измерение оптической плотности проводили каждые 15 сек в течение 105 сек (1,75 мин) на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО). Изменение оптической плотности в единицу времени (за минуту) оценивали как скорость реакции автоокисления адреналина. В аналогичных условиях измеряли

скорость автоокисления адреналина в опытной пробе, в которую до внесения адреналина добавляли 0,1 мл СЖ.

В работе использованы следующие реактивы: 0,1% раствор адреналина гидрохлорида (аптечная форма); Na_2CO_3 “Sigma” (США); NaHCO_3 “J.T. Baker” (Голландия). 0,2 М карбонатный буфер готовили из Na_2CO_3 , pH устанавливали добавлением к раствору сухого NaHCO_3 до необходимой величины pH. Растворы готовили на бидистиллированной воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ. На рисунке представлена кинетическая кривая, отражающая скорость автоокисления адреналина в контрольной пробе при длине волны 347 нм. Показано изменение величины оптической плотности раствора во времени. В данных условиях измерения наблюдается линейный характер реакций автоокисления адреналина. Принимая это во внимание, была рассчитана скорость (V) процесса как отношение изменения оптической плотности ко времени ($\Delta E/t$), где ΔE изменение оптической плотности, т.е. $\Delta E = E_t - E_0$, где E_0 - оптическая плотность раствора, измеренная сразу после добавления адреналина; E_t - оптическая плотность раствора через 105 сек (1,75 мин) после добавления адреналина; t - время в мин.

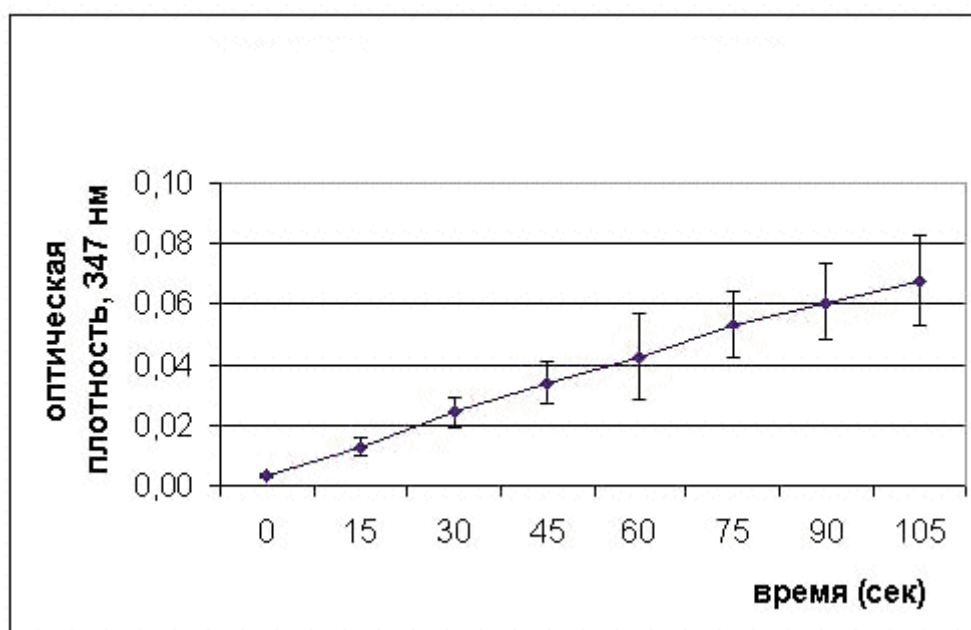


Рисунок.

Кинетика автоокисления адреналина в контрольной пробе (отсутствие СЖ). Условия измерения: 0,2 М карбонатный буфер, pH 10,55, реакцию начинали добавлением 0,26 мМ адреналина гидрохлорида.

Рассчитанная скорость автоокисления адреналина в контрольной пробе (в отсутствии СЖ) составляла $0,0439 \pm 0,0147$ оптических единиц/мин. Такая величина скорости автоокисления адреналина поддерживалась и корректировалась в процессе всех исследований путем добавления растворов HCl или NaOH. Эта величина интенсивности реакции принималась за 100%.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ

В аналогичных условиях измеряли скорость автоокисления адреналина в опытной пробе в присутствии СЖ. Процент ингибирования или активации реакции в присутствии СЖ вычисляли по формуле:

$$[1 - (\Delta E_{\text{опыт}} / \Delta E_{\text{контроль}})] \cdot 100\%,$$

где $\Delta E_{\text{опыт}}$ и $\Delta E_{\text{контроль}}$ – скорости реакции автоокисления адреналина, соответственно, в присутствии и отсутствии СЖ.

Способность СЖ ингибировать эту реакцию, оценивалась как антиоксидантная активность, а активация реакции в присутствии СЖ – как прооксидантная. Анти- и прооксидантную активность СЖ выражали в условных единицах: 1 условная единица – это 1% активации (+1 усл.ед.) или 1% ингибирования (-1 усл.ед.) в пересчете на 1 мл СЖ (удельная активность СЖ).

В таблице представлены данные величины скорости (V) автоокисления адреналина в присутствии СЖ каждого пациента всех групп и рассчитана удельная анти- или прооксидантная активность СЖ.

Таблица. Скорость (V) автоокисления адреналина в присутствии СЖ каждого пациента разных исследованных групп и рассчитанная удельная анти- и прооксидантная активность СЖ этих пациентов (в условных единицах/мл СЖ).

№ исследуемого лица	Группы	$V = \Delta E / \Delta t$	Анти- и прооксидантная активность (усл. ед./мл СЖ)*
1	Клинически здоровые лица	0,028	-362,2
2		0,017	-612,7
3		0,014	-681,2
4		0,014	-681,2
5		0,025	-430,5
6		0,041	-66,1 [#]
7		0,054	+230,0 [#]
8		0,017	-612,2
			Средняя (n=6): -563,3±122,96
9	Лица с ОРВИ		+1396,0
10			-544,4 [#]
11			+526,2
12			+1505,7
13			+1050,1
14			+1505,7
15			+1050,1
			Средняя (n=6): +1167,8±343,6
16	Лица, принимавшие витамины		-157,2 [#]
17			-749,4
18			-726,6
19			-726,6
20			-681,1
			Средняя (n=6): -721,0±24,8

Примечание: * - Антиоксидантная активность (-) - % ингибирования, прооксидантная активность (+) - % активации; [#] - данные, исключённые из выборки.

У 6 клинически здоровых людей из 8 обследованных СЖ обладала в основном выраженной антиоксидантной активностью, и средняя величина АОА ($n=6$) составляла $-563,3 \pm 134,7$ (усл.ед./мл). Однако следует отметить, что у одного пациента из этой группы АОА была низкой ($-66,1$ усл.ед./мл), а у другого пациента этой же группы СЖ имела прооксидантную активность ($+230,0$ усл.ед./мл) и эти данные не учитывались при расчете средней величины для данной группы пациентов. Проведенные исследования показали, что СЖ здоровых людей обладает определенным уровнем антиоксидантной активности, поскольку способна тормозить скорость автоокисления адреналина, и является, таким образом, “ловушкой” супероксидных радикалов, образующихся в реакции автоокисления адреналина.

В группе людей с признаками ОРВИ у 6 из 7 обследованных отмечено отсутствие антиоксидантной активности СЖ и появление в ней прооксидантных свойств, о чем свидетельствует изменение направленности действия СЖ на реакцию автоокисления адреналина. В присутствии СЖ этой группы лиц происходило ускорение реакции, что обусловлено, вероятно, наличием в её составе пероксидных продуктов, образованных в процессе вирусной агрессии. У одного из этих 6 человек она была относительно невысокой и составляла $+526,2$ усл.ед./мл, у остальных 5 человек была значительно выше и варьировала в диапазоне от $+1050,1$ до $+1505,7$ усл.ед./мл. У пациента № 10 этой группы сохранилась антиоксидантная активность СЖ ($-544,4$ усл.ед./мл), что, вероятно, связано с индивидуальным состоянием организма: высокая активность системы АОЗ или слабо выраженный инфекционный процесс. Это свидетельствует о том, что используемый метод оценки АОА слезной жидкости позволяет выявлять индивидуальные ее особенности, которые зависят от состояния организма.

В группе лиц, принимавших поливитамины (5 человек), выявлена только антиоксидантная активность СЖ и ее величина была достоверно ($p < 0,02$) выше в среднем на 22%. Только у одного пациента из этой группы она была сравнительно невысокой и составила $-157,2$ усл.ед./мл.

ОБСУЖДЕНИЕ. Слеза – это прозрачная жидкость с удельным весом 1,001–1,008. Она содержит 97,8% воды, белок, мочевины, сахар, натрий, калий, хлор, сиаловую кислоту; в ней установлено присутствие аминокислот, глюкозы, лактата, пирувата и других метаболитов, слеза содержит фермент лизоцим, обладающий бактерицидным действием и другие компоненты, присутствие которых в СЖ зависит не только от состояния органов зрения, но и всего организма в целом [5, 21–23]. Защитные функции СЖ реализуются как путем чисто механического очищения поверхности глазного яблока, так и за счёт содержащихся в ней специфических и неспецифических факторов. К числу первых большинство авторов относят иммуноглобулины класса А (Ig A и Ig A-S), M, G, E, D, а также фракции C3 и C4 комплемента [5, 20, 22]. При воспалительных заболеваниях к перечисленным выше компонентам иммунной и неспецифической резистентности добавляются белки сыворотки крови (трансферрин, интерферон, гаптоглобин, С-реактивный белок и др.) [5]. По данным многих авторов, неспецифические факторы, содержащиеся в крови, попадают в СЖ путем фильтрации через стенку конъюнктивных сосудов [5, 9, 22, 23]. Кроме того, их продуцируют главные и добавочные слёзные железы, а так же добавочные желёзки и клетки конъюнктивы век.

Наиболее сильно изменяется химический состав СЖ при различных заболеваниях воспалительного характера, затрагивающих конъюнктиву или роговицу и сопровождающихся деструкцией эпителия и нарушением проницаемости сосудов конъюнктивы [5, 10, 13, 21].

Известно, что свободнорадикальное окисление - это физиологически необходимый метаболический процесс, происходящий во всех тканях организма человека. Перекисные процессы в тканях глаза являются частью защитного механизма от бактерий, вирусов, инородных тел, собственных тканей и клеток, утративших иммунологическую специфичность в результате травмы или

малигнизации. Показано, что при различных формах патологии глаза в его средах возрастает содержание продуктов пероксидных реакций [13].

Проведённые исследования установили, что СЖ практически здоровых людей обладает выраженной антиоксидантной активностью. В процессе развития ОРВИ отмечается полное истощение антиоксидантных свойств СЖ и увеличение количества веществ обладающих прооксидантной активностью. Профилактический прием поливитаминов приводит к увеличению АОА СЖ. Антиоксидантное действие СЖ было установлено ранее Kuizenga и соавт. [24] при использовании ими ксантин-ксантинооксидазной системы, генерирующей супероксидные радикалы.

Дальнейшее изучение состояния системы АОЗ у пациентов с глазной патологией, а так же оценка эффективности терапии препаратами с антиоксидантными свойствами позволит определить новые подходы к диагностике, адекватному лечению, мониторингу эффективности терапии и прогнозу глазных заболеваний.

Предложенная нами методика исследования антиоксидантных свойств СЖ является простой, доступной высокоинформативной, предполагает использование недорогих химических реактивов и оборудования и может быть рекомендована для широкого применения в офтальмологии.

ВЫВОДЫ.

1. Для исследования антиоксидантных СЖ предложена методика, которая отличается простотой, доступностью и высокой информативностью.
2. Показано, что СЖ клинически здоровых людей обладает выраженной антиоксидантной активностью.
3. При наличии ОРВИ в СЖ пациентов наблюдается не только полное истощение антиоксидантной активности, но и выявляются прооксидантные свойства.
4. Прием поливитаминов в профилактических дозах достоверно повышает антиоксидантную активность СЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Droge W. (2002) *Physiol. Rev.*, **82**, 47-95.
2. Терехина Н.А., Петрович Ю.А., Батуева Р.А., Соснин Д.Ю., Весна В.А. (1998) *Клин. лаб. диагн.*, №1, 13-15.
3. Бунин А.Я., Филина А.А., Еричев В.П. (1992) *Вестн. Офтальмол.*, **108**(4-6), 13-15.
4. Курышева Н.И., Колединцев М.Н., Шилкин Г.А., Ярцева Н.С., Артамонов В.П., Беляев В.И. (1999) *Вестн. Офтальмол.*, **115**(5), 5-6.
5. Петрович Ю.А., Терехина Н.А. (1990) *Вопр. мед. химии*, **36**(3), 13-18.
6. Акберова С.И., Мусаев Гамбинур П.И. (1998) *Вестн. офтальмол.*, **114**(3), 31-34.
7. Бржеский В.В. (1990) *Слезная жидкость в диагностике некоторых повреждений и заболеваний глаз: Дисс.канд. мед. наук.*, Военно-медицинская академия, С.-Петербург.
8. Петрович Ю.А., Терехина Н.А., Батуева Р.А. (1989) *Лаб. дело*, №6, 27-30.
9. Пири А., Гейнинген Р. (1968) *Биохимия глаза*. М.: Медицина.
10. Чеснокова Н.Б., Шутов П.А. (1982) В сб.: *Вирусные заболевания глаз*. М., с. 36-38.
11. Хлебникова Н.Н., Таришц Д.Л., Носкин Л.А., Карганов М.Ю. и др. (1999) *Лазерная медицина*, **3**(3-4), 67-73.
12. Мошетьева Л.К., Яценко О.Ю., Яровая Г.А., Нешкова Е.А. (2004) *Российские медицинские вести*, **9**(4), 50-53.
13. Шаимова В.А. (2002) *Вестн. офтальмол.*, **118**(3), 56-57.
14. Колединцев М.Н., Майчук Н.В. (2002) *Новое в офтальмологии*, **4**, 32-37.

15. *Сирота Т.В.* (2000) Патент РФ № 2144674 (приоритет от 24.02.1999 г.) Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений.
16. *Сирота Т.В.* (1999) *Вопр. мед. химии*, **45**, 263-272.
17. *Sirota T.V., Lange N.V., Kosjakova N.I., Vanichkin A.V., Kondrashova M.N.* (2000) *Current Topics in Biophysics*, **24**, 185-189.
18. *Vishnevsky E.L., Kondrashova M.N., Pushkar D.Y., Vishnevsky A.E., Demidov A.A., Sirota T.V. et al.*, (2003) *Mitochondrion*, **3**, 67-73.
19. *Sirota T.V., Khunderyakova N.V., Kondrashova M.N.* (2002) *Proceeding of 7-th International symposium on "Metal Ions in Biology and Medicine"*, S.-Petersburg, Russia, 495-497.
20. *Misra H.P., Fridovich I.* (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3170-3175.
21. *Касавина Б.С., Кузнецова Т.П.* (1978) *Вестн. офтальмол.*, **5**, 79-82.
22. *Сомов Е.Е., Бржеский В.В., Пирогов Ю.И.* (1991) *Офтальмол. журн.*, **2**, 113-117.
23. *Канаева В.Г.* (2002) *Глазные болезни*, М., Медицина.
24. *Kuizenga F., Van Haeringen N.I., Kijlstra A.* (1987) *Invest.Ophthalm.*, **28**, 305-313.

Поступила: 07. 12. 2005.

THE ESTIMATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LACRIMAL FLUID

A.I. Gritsuk¹, T.V. Sirota², L.V. Dravitsa¹, E.A. Craddock¹

¹Gomel State Medical University, Ministry of Health of Republic Belarus, Gomel, 246050 Belarus, e-mail: gritsuk@inbox.ru

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya, 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia
e-mail: sirotatv@rambler.ru

A new approach for evaluation of the antioxidant activity of lacrimal fluid (LF) has been proposed. It is based on the method of the analysis of the antioxidant activity of blood and superoxide dismutase activity (Sirota T.V., 1999). In the present work, the method has been first used for examining the antioxidant properties of LF, which is estimated by the ability of LF to inhibit or activate the rate of adrenaline autooxidation in an alkaline medium. The method does not require expensive reagents and equipment; it is simple, accessible, and highly informative. LF of practically healthy people possesses a marked antioxidant activity. In people with symptoms of acute respiratory virus infections, complete loss of the antioxidant activity of LF and the appearance of prooxidant activity were observed. In people taking polyvitamins in prophylactic doses, a significant increase in the antioxidant activity of LF was observed. This method may be applicable in ophthalmology for the diagnosis, control of treatment efficiency, and prognosis of eye diseases.

Key words: lacrimal fluid, autooxidation of adrenaline, superoxide, antioxidant activity, prooxidant activity.