

Реук С.Э., Терехина Н.А.

Хемилюминесцентный анализ биологических жидкостей при герпетической инфекции у детей

ФГБОУ ВО ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь

Reuk S.E., Terekhina N.A.

Chemiluminescence analysis of biological fluids in herpetic infection in children

Резюме

Проведен хемилюминесцентный анализ слезы, ротовой жидкости, плазмы и эритроцитов крови детей при герпетическом кератите, а также ротовой жидкости, плазмы и эритроцитов крови детей при остром герпетическом стоматите в динамике заболевания. При герпетической инфекции интенсивность показателей хемилюминесценции слезы и ротовой жидкости коррелирует с показателями плазмы и эритроцитов крови. При офтальмогерпесе увеличение показателей максимальной интенсивности вспышки, светосуммы хемилюминесценции, светосуммы после максимального значения хемилюминесценции в слезе свидетельствует об интенсификации свободнорадикального окисления. При остром герпетическом стоматите показатели хемилюминесценции ротовой жидкости, плазмы и эритроцитов крови коррелируют с тяжестью заболевания. Высокая чувствительность хемилюминесцентного анализа слезы и ротовой жидкости позволяет рекомендовать его как неинвазивный метод оценки эффективности лечения герпетической инфекции у детей.

Ключевые слова: герпетический стоматит, офтальмогерпес, слеза, ротовая жидкость, плазма крови, эритроциты, хемилюминесцентный анализ

Summary

Chemiluminescent analysis of tears, oral fluid, plasma and red blood cells of children with herpetic keratitis, as well as oral fluid, plasma and red blood cells of children with acute herpetic stomatitis in the course of the disease was carried out. With herpetic infection, the intensity of the chemiluminescence indices of the tear and oral fluid correlates with the indices of plasma and blood erythrocytes. In the case of an ophthalmoherpese, an increase in the maximum flash intensity, a light sum of chemiluminescence, and a light sum after the maximum value of chemiluminescence in a tear testifies to the intensification of free radical oxidation. In acute herpetic stomatitis the parameters of chemiluminescence of oral fluid, plasma and red blood cells correlate with the severity of the disease. The high sensitivity of chemiluminescent analysis of tears and saliva can be recommended as a non-invasive method of assessing the effectiveness of treatment of herpetic infection in children.

Key words: chemiluminescence, tear, oral fluid, ophthalmoherpese, herpetic stomatitis, plasma, erythrocytes

Введение

Хемилюминесцентный анализ биологических жидкостей используется в прогнозировании и оценке эффективности лечения стоматологических [14], хирургических [7], сердечно-сосудистых [6] заболеваний, сахарного диабета [9], интоксикаций [1]. Интенсивность хемилюминесценции эритроцитов [8], лимфоцитов [10], слезы [17, 18, 19] при офтальмогерпесе свидетельствует об усилении процессов свободнорадикального окисления.

Инфицированность вирусом простого герпеса опережает скорость прироста населения Земли, что в значительной мере связано с распространением бессимптомных и недиагностируемых форм заболевания [15, 16]. Избирательная способность вируса к первичной инвазии в клетки эпидермиса и слизистых оболочек определяет

высокую вирулентность герпетической инфекции. Вирус герпеса изменяет проницаемость гистогематических барьеров, активность ферментов, перестраивает клеточный метаболизм, стимулирует синтез нуклеиновых кислот [4].

Ведущая роль среди вирусных заболеваний глаз и полости рта принадлежит заболеваниям герпетической природы. Офтальмогерпес у детей составляет 70-80% от числа воспалительных заболеваний роговицы и характеризуется рецидивирующим течением и тяжелыми осложнениями [13]. Острый герпетический стоматит у детей составляет 80-85% всех заболеваний слизистой оболочки полости рта, а формирование хронических форм герпетической инфекции является одним из неблагоприятных исходов этого заболевания и в последние годы имеют выраженную тенденцию к увеличению.

Анализ слезной жидкости позволяет прогнозировать рецидив офтальмогерпеса как у взрослых [12], так и у детей [13]. Слеза взрослого человека при герпетическом кератите теряет способность ингибировать образование гидроксилрадикала, из нее почти полностью исчезает аскорбиновая кислота и уменьшается содержание α -токоферола [17]. Обосновано применение неферментативных антиоксидантов в лечении больных офтальмогерпесом [5].

Цель работы – оценить и сравнить показатели хемилюминесцентного анализа слезы, ротовой жидкости, плазмы и эритроцитов крови при офтальмогерпесе и остром герпетическом стоматите у детей.

Материалы и методы

Объектом исследования явились слеза, ротовая жидкость, плазма и эритроциты крови 11 детей больных герпетическим кератитом, а также смешанная слюна, эритроциты и плазма крови 24 детей больных острым герпетическим стоматитом различной степени тяжести. В качестве группы сравнения были взяты слезная, ротовая жидкость, эритроциты и плазма периферической крови 39 здоровых детей.

Слезную жидкость собирали по методу [11], ротовую жидкость по методу [3]. Определение индуцированной хемилюминесценции проводили в автоматическом режиме на биокемилуминометре ХЛ-7, сопряженном с компьютером IBMPC по методу [2].

Увеличение продукции свободных радикалов сопровождается ростом интенсивности хемилюминесценции. Для оценки интенсивности индуцированной хемилюминесценции определяли максимальную интенсивность вспышки хемилюминесценции за 30 секунд (I_{max}), светосумму хемилюминесценции (S), светосумму после максимального значения хемилюминесценции (SI_{max}), тангенс угла максимального наклона кривой к оси времени ($tg2$), показатель ZI_{max} , коэффициенты a и Z .

Показатель I_{max} прямопропорционален содержанию перекисных продуктов и характеризует потенциальную способность биологической жидкости к свободнорадикальному окислению. Светосумма хемилюминесценции, измеряемая за 30 секунд, свидетельствует о способности биологического материала подвергаться окислению и отражает содержание радикалов RO , соответствующих обрыву цепи свободнорадикального окисления. Этот показатель дает возможность оценить систему равновесия перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности. Антиоксидантный потенциал пробы коррелирует с показателем $tg2$ и коэффициентами a и Z : чем выше значения показателя $tg2$ и ниже значения a и Z , тем более выражена антиоксидантная активность в исследуемой пробе.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с применением программы «Statistica 6,0» и пакета Microsoft Office 2007. Количественные данные представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки ($M \pm m$) с использованием критерия Стьюдента. Критический уровень значимости P для

статистических критериев принимали равным 0,05. Для оценки линейной зависимости между параметрами использовали коэффициент корреляции Пирсона (r). При этом величина $|r|$ более 0,7 свидетельствовала о сильной зависимости, средняя связь параметров характеризовалась при $|r|$ равном 0,69–0,3, величина $|r|$ меньше 0,29 расценивалась как слабая.

Результаты и обсуждение

При герпетическом кератите достоверно увеличиваются показатели I_{max} , S и SI_{max} слезы пораженного глаза детей в 1,5–2,5 раза по сравнению с контролем при всех клинических формах заболевания (таблица 1). Снижение показателя $tg2$ слезы и увеличенные показатели Z и a по сравнению с контролем свидетельствует о низкой антиоксидантной защите роговицы герпесинфицированного глаза детей. Показано, что в слезе контрлатерального глаза показатели I_{max} , S , SI_{max} при офтальмогерпесе, также, как и в инфицированном глазу, статистически значимо увеличиваются, хотя их значения меньше, чем в слезе герпесинфицированного глаза. Свободнорадикальные реакции окисления инициируются при снижении антиоксидантной защиты роговицы контрлатерального глаза, на что указывает снижение показателя $tg2$ и увеличение показателей Z и a в слезной жидкости детей при герпетическом кератите.

При герпетическом кератите изменяются показатели хемилюминесценции не только слезы, но и ротовой жидкости, плазмы крови и эритроцитов (таблица 1). В ротовой жидкости детей при герпетическом кератите статистически значимо в 1,5–2,5 раза увеличиваются показатели I_{max} , S , SI_{max} . Об интенсификации свободнорадикального окисления при офтальмогерпесе в разгар заболевания свидетельствует увеличение показателей S , I_{max} , и SI_{max} как в плазме, так и в эритроцитах крови по сравнению с контролем. При увеличении интенсивности перекисного окисления липидов в эритроцитах детей в период разгара герпетического кератита прослеживается обратная связь между показателями антиоксидантного потенциала $tg2$ и S , I_{max} и SI_{max} . В плазме крови детей при офтальмогерпесе в 1,5 раза снижается показатель $tg2$ по сравнению с контролем. Следует отметить, что при герпетическом кератите показатели хемилюминесценции плазмы и эритроцитов крови детей изменяются идентично, что подтверждается образованием прямых связей между показателями S ($r = 0,44$), I_{max} ($r = 0,36$), SI_{max} ($r = 0,61$) и $tg2$ ($r = 0,50$). После проведенного лечения при выписке из стационара детей, перенесших герпетический кератит, показатели хемилюминесцентного анализа слезы, ротовой жидкости, плазмы и эритроцитов крови полностью нормализуются.

При остром герпетическом стоматите в ротовой жидкости детей достоверно увеличиваются показатели I_{max} , S и SI_{max} (таблица 2). При легкой степени острого герпетического стоматита достоверно увеличивается только показатель I_{max} . При остром герпетическом стоматите средней степени тяжести увеличиваются значения показателей S и I_{max} на фоне снижения в 2 раза показате-

Таблица 1. Показатели хемилюминесценции (M±m) слезной и ротовой жидкостей, эритроцитов и плазмы крови детей при герпетическом кератите

	Слеза инфицированного глаза	Слеза контрлатерального глаза	Ротовая жидкость	Плазма крови	Эритроциты
I_{max} (мВ)					
Здоровые дети	678,0±75,7		273,8±24	438,3±22,3	23,9±2,4
Герпетический кератит	884±57*	763,8±130	478±44,7*	558,5±37,1*	56,5±7,3*
S (мВ·сек)					
Здоровые дети	2612,9±297,0		1395,6±124	3124±156,9	63,8±9,4
Герпетический кератит	5893±458*	4009±463*	3301±287*	5387±425*	109,7±10*
SI_{max} (мВ·сек)					
Здоровые дети	2275,0±262,15		1234±109	2715,6±160	99,8±14,94
Герпетический кератит	5840±324*	3841±569*	2879±256*	5612±445*	143±9,8*
α					
Здоровые дети	0,129±0,01		0,174±0,01	0,226±0,01	0,097±0,01
Герпетический кератит	0,27±0,02*	0,232±0,01*	0,211±0,02	0,217±0,01	0,091±0,01
Z					
Здоровые дети	3,85±0,13		4,92±0,46	6,43±0,23	6,25±0,63
Герпетический кератит	7,06±0,74*	6,89±0,33*	6,42±0,46*	6,26±0,48	6,67±0,27
ZI_{max}					
Здоровые дети	3,36±0,16		4,61±0,26	6,09±0,16	4,48±0,56
Герпетический кератит	6,1±0,79*	5,94±0,3*	5,93±0,39*	5,43±0,38	5,33±0,37
tg2					
Здоровые дети	-196,5±34,7		-107,5±11	-134,8±5,0	-11,35±1,1
Герпетический кератит	-324±46*	-286±15,8*	-143±25,3	-214±31,6*	-20,1±2,31*

* P < 0,05

Таблица 2. Показатели хемилюминесценции (M±m) ротовой жидкости, плазмы и эритроцитов крови детей при остром герпетическом стоматите

Показатель	Ротовая жидкость				Плазма крови		Эритроциты	
	Здоровые дети	Степень тяжести герпетического стоматита			Здоровые дети	Герпетический стоматит	Здоровые дети	Герпетический стоматит
		Легкая степень	Средняя степень	Тяжелая степень				
I _{max} (мВ·с)	273,83±24,14	396,67±31,72*	514,4±49,5*	660,8±58,8*	438,3±22,3	684,9±16,4*	23,9±2,4	38,6±3,8*
S (мВ)	1395,6±123,6	1502,67±136,1	2194±331,3*	2266,7±166*	3124±157	6156,2±253*	63,8±9,4	107,1±10,7*
SI _{max} (мВ·с)	1233,6±109,2	14,53±158,34	1822,2±322	1943±177,4*	2716±160	5224±189*	99,8±15	160±14,7*
α	0,174±0,01	0,163±0,01	0,145±0,02	0,14±0,02	0,226±0,01	0,29±0,01*	0,1±0,01	0,15±0,01*
Z	4,92±0,46	4,68±0,33	4,36±0,57	4,32±0,4	6,43±0,23	8,01±0,43*	6,25±0,6	8,9±0,6*
ZI _{max}	4,61±0,26	4,49±0,39	3,75±0,61	3,77±0,45	6,09±0,16	7,25±0,31*	4,48±0,6	7,17±1,1*
tg2	-107,5±10,96	-130,42±9,67	-219,1±37*	-244,8±32*	-139,9±7,2	-162,8±3,5*	-11,4±1,1	-25,7±3,7*

* P < 0,05

ля tg2, характеризующего антиоксидантную активность. Наибольшие изменения показателей хемиллюминесценции наблюдаются при тяжелом остром герпетическом стоматите, когда увеличиваются в 1,5-2 раза показатели S, I_{max}, и SI_{max}, а значение tg2 статистически значимо снижается по сравнению с контролем.

После проведенного лечения детей, перенесших острый герпетический стоматит легкой степени, нормализуются все показатели хемиллюминесценции ротовой жидкости. При выписке детей, перенесших стоматит средней степени тяжести, показатель I_{max} остается повышенным. У детей после тяжелого острого герпетического стоматита все измененные показатели (S, I_{max}, и SI_{max}, tg2) не нормализуются и статистически значимо отличаются от показателей здоровых детей.

Наибольшие изменения показателей хемиллюминесценции плазмы и эритроцитов крови у детей установлены при тяжелом остром герпетическом стоматите: значения показателей S, I_{max}, и SI_{max} в разгар острого герпетического стоматита увеличиваются в 1,5-2,5 раза по сравнению с контролем (таблица 2). Выявлена прямая корреляция между показателями хемиллюминесценции плазмы и эритроцитов крови при остром герпетическом стоматите у детей: сильные прямые зависимости показаны для параметров S ($r=0,71$), I_{max} ($r=0,75$), и SI_{max} ($r=0,83$) и выявлена обратная зависимость показателя tg2 ($r=-0,36$).

Заключение

При герпетическом кератите увеличенные показатели I_{max}, S, SI_{max} не только в слезе инфицированного, но и клинически здорового контрлатерального глаза детей свидетельствует об интенсификации свободнорадикаль-

ного окисления. За счет высоких адаптационных возможностей антиоксидантной системы после лечения детей, перенесших герпетический кератит, показатели хемиллюминесцентного анализа биологических жидкостей и кровоток крови нормализуются.

При остром герпетическом стоматите показатели хемиллюминесценции ротовой жидкости, плазмы и эритроцитов периферической крови коррелируют с тяжестью течения герпетического поражения слизистой оболочки полости рта. При офтальмогерпесе и остром герпетическом стоматите интенсивность показателей хемиллюминесценции слезы и ротовой жидкости коррелирует с показателями плазмы и эритроцитов периферической крови. Высокая чувствительность и простота проведения хемиллюминесцентного анализа слезы, ротовой жидкости позволяют рекомендовать его как высокоинформативный неинвазивный метод оценки эффективности лечения офтальмогерпеса и острого герпетического стоматита у детей. ■

Реук С.Э. – к.м.н., доцент кафедры биохимии Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера, г. Пермь. Терехина Н.А. – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой биохимии Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера, г. Пермь. Автор, ответственный за переписку: Реук С.Э. – к.м.н., доцент кафедры биохимии Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера, г. Пермь: адрес для переписки: 614022, г. Пермь, ул. Крупской д. 44; кафедра биохимии, тел. 89194751755, e-mail: svetlana.reuk@rambler.ru

Литература:

1. Камиллов Р.Ф., Ханов Т.В., Яптаров Р.Н., Шакиров Д.Ф. Хемиллюминесценция как метод оценки общей антиокислительной активности крови, слюны, слезной жидкости и мочи. *Клин. лаб. диагностика*. 2009; 2: 21-2, 35-6.
2. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемиллюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах. *Биохимия и биофизика микроорганизмов: межвузовский сборник*. Горький; 1983. 179-183.
3. Леонтьев В.К., Петрович Ю.А. *Биохимические методы исследования в клинической и экспериментальной стоматологии: методическое пособие*. Омск; 1976.
4. Петрович Ю.А., Терехина Н.А. Ферментная стратегия вируса простого герпеса. *Успехи совр. биологии*. 1990; 51 (1): 77-89.
5. Терехина Н.А., Горячев Ю.Е., Реук С.Э. Обоснование использования неферментативных антиоксидантов в лечении больных офтальмогерпесом. *Пермский медицинский журнал*. 2003; 2: 43-6.
6. Терехина Н.А., Горячева О.Г., Зубарев М.А. Прогностическое значение параметров антиоксидантной защиты при инфаркте миокарда. *Клин. лаб. диагностика*. 2007; 9: 48.
7. Терехина Н.А., Зитта Д.В., Субботин В.М. Возможности хемиллюминесцентного анализа в прогнозировании осложнений раннего послеоперационного периода у больных колоректальным раком. *Колоректология*. 2015; 1: 86-6а.
8. Терехина Н.А., Караваев В.Г. Активность антиоксидантных ферментов эритроцитов при герпетическом кератите. *Клин. лаб. диагностика*. 2003; 7: 38-9.
9. Терехина Н.А., Ненашева О.Ю. Хемиллюминесцентный анализ биологических жидкостей больных сахарным диабетом. *Клин. лаб. диагностика*. 2004; 11: 38-9.
10. Терехина Н.А., Петрович Ю.А. Активность антиоксидантных ферментов и хемиллюминесценция лимфоцитов периферической крови при инфицировании глаза вирусом простого герпеса. *Вопросы медицинской химии*. 1992; 5: 62-3.

11. Терехина Н.А., Петрович Ю.А., Батуева Р.А. Влияние метода сбора слезной жидкости на ее состав. *Клин. лаб. диагностика*. 1989; 6: 27-30.
12. Терехина Н.А., Петрович Ю.А., Гольдфельд Н.Г. Прогнозирование рецидивов герпетического кератита с помощью определения активности дегидрогеназ слезной жидкости. *Вестник офтальмологии*. 1988; 6: 42-5.
13. Терехина Н.А., Реук С.Э., Петрович Ю.А. Использование ферментного анализа слезной жидкости для прогнозирования рецидива герпетического кератита у детей. *Вестник офтальмологии*. 2007; 123(4): 23-4.
14. Фархутдинов Р.Р., Шайдуллина Х.М., Кравец О.Н. Использование хемилуминесцентных методов исследования в стоматологии. *Проблемы стоматологии*. 2007; 1: 9-13.
15. Gilbert S., Corey L., Cunningham A. et al. An update on short-course intermittent and prevention therapies for herpes labialis. *Herpes*. 2007; 14 (1) 13A-8A.
16. Malkin J.E. Stanberry L. Orofacial herpes simplex virus type 1 infection. recommendations from the IHMF management strategies. *Workshop Cambridge Med Pub*. 2004; 15-27.
17. Terekhina N.A. Antioxidant defence in herpetic keratitis. *Proceeding of the XVI International Congress Clinical Chemistry*; 1996; London: 65.
18. Terekhina N.A., Petrovitch J.A., Solovyeva L.I. Antioxidants of tear in herpetic infection. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39 (Suppl): 116.
19. Terekhina N.A., Petrovitch Y.A., Reuk S.E. Antioxidants of tear in viral infection. *Clin Chem Lab Med*. 2003; (Suppl): 191.