

ИК-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В РОГОВИЦЕ

О. Б. Рудаков¹, Н. К. Полянская², О. В. Байдичева¹, С. И. Карпов³, Л. В. Рудакова⁴

¹ Воронежский архитектурно-строительный университет,

² Воронежская областная клиническая офтальмологическая больница,

³ Воронежский государственный университет,

⁴ Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко

Поступила в редакцию 15.07.2008 г.

Аннотация. Показано, что изменение интенсивности полос поглощения пептидных групп в ИК-спектре белковых веществ, содержащихся в слезной жидкости, может быть использовано в диагностике этиологии и контроле воспалительного процесса в роговице.

Ключевые слова: ИК-спектроскопия, офтальмология, слезная жидкость, лизоцим, диагностика заболеваний.

Abstract. Change of intensity absorption bands of peptide groups in the IR-spectrum of the proteins contained in plaintive liquid is shown, can be used in diagnostics of etiology and the control of inflammatory process over a cornea.

Keywords: IR-spectroscopy, ophthalmology, plaintive liquid, lysozyme, diagnostics of diseases.

ВВЕДЕНИЕ

Аналитическим методам и средствам обнаружения разного рода патологических изменений в организме человека уделяется в последнее время исключительно большое внимание. Одним из важных направлений этой работы является диагностика офтальмологических заболеваний [1—3].

Основными методами диагностики этиологии воспалительного или трофического заболевания роговицы являются исследование мазков с конъюнктивы на флору, бактериологический посев с поверхности роговицы на питательные среды, иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Мазок с конъюнктивы и бактериологический посев информативны только при бактериальных и грибковых процессах в роговице и дают информацию только в 30 % случаев. При трофических процессах в роговице и при вирусной этиологии кератита — их значение равно нулю. В связи с этим возникает необходимость поиска доступного для врача и пациента метода экспресс-диагностики этиологии патологического процесса в роговице.

Беспорным объектом анализа при диагностике глазных болезней является слезная жидкость (СЖ) — многокомпонентный секрет, в котором наиболее важными составляющими являются

белки [1—3]. Белки СЖ имеют сложный фракционный состав — до 60 фракций. Известно, что при воспалительных процессах содержание общего белка в СЖ умеренно повышается. В первую очередь, это связано с тем, что некоторые белковые компоненты СЖ выполняют функции неспецифической защиты — это лактоферрин, церулоплазмин, лизоцим (20—29 % белка слезы обладает выраженным бактерицидным действием на грамположительную флору). Таким образом, СЖ является универсальным индикатором нарушения обменных процессов при патологических состояниях органа зрения, а контроль динамики изменения состава и количества белков в СЖ является одним из возможных способов клинической диагностики в офтальмологии. В работах [3, 4] описан новый способ диагностики с применением метода ИК-спектроскопии. Целью данной работы явилось изучение возможностей этого способа диагностики заболеваний роговицы и контроля над процессом лечения с применением типового ИК-спектрометра и общедоступного программного обеспечения.

Методология исследования заключалась в проведении анализа ИК-спектров СЖ до, в процессе и после лечения пациентов с различной патологией заболевания роговицы, количественном определении содержания общего белка и сопоставлении полученных данных с результатами анализа в контрольной группе здоровых лиц.

© Рудаков О. Б., Полянская Н. К., Байдичева О. В., Карпов С. И., Рудакова Л. В., 2009

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве реперного вещества для получения градуировочных зависимостей содержания белковых фракций в СЖ и интерпретации ИК-спектров использовали препарат лизоцима, применяемый в пищевой промышленности. Для построения градуировочной зависимости готовили модельные растворы лизоцима в изотоническом растворителе (0,9 %-ный водный раствор NaCl) в диапазоне концентраций белка 5÷20 г/л, характерного для общего содержания белков в СЖ.

Для получения ИК-спектров образцов СЖ и модельных растворов применяли специально разработанную методику [4]. В качестве подложки использовали пластины из монокристаллического кремния. Микрошприцом наносили 10 мкл СЖ на пластинки кремния. После испарения при комнатной температуре жидкой фазы, обдуваемой азотом и кристаллизации компонентов СЖ на поверхности кремния, регистрировали ИК-спектры образцов на ИК-спектрометре ИнфраЛЮМ ФТ-02 в диапазоне 500—3500 см⁻¹. Было обследовано 20 больных с патологией роговицы и 7 офтальмологически здоровых человек. Полученные ИК-спектры количественно обрабатывали методом базовой линии с помощью программы редактирования спектров Grams/32 R Version 4.02 Spectral Notebook. Сопоставление интенсивности полос поглощения проводили в оболочке табличного процессора Microsoft Excel.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее установлено, что ИК-спектры разных образцов СЖ демонстрируют различия преимущественно в интенсивности соответствующих характеристичных полос при незначительном их смещении. Например, чем больше интенсивность полосы в области 1646—1652 см⁻¹, тем выше содержание белковых фракций в СЖ. При наличии нарушений в обмене веществ или заболеваниях органов зрения происходит более интенсивная секреция белка, направленного на восстановление обмена веществ. Интенсивность характеристичной полосы наиболее адекватно характеризуется площадью соответствующего пика S_i в ИК-спектре. При изменении структуры и соотношения количеств различных белковых веществ, обусловленных динамикой биохимических процессов, сопровождающих разные стадии заболевания, интенсивность поглощения характеристичных полос, а значит, и соотношение площадей характеристичных пиков может изменяться в различной степени.

Обнаружение повышенного содержания белка в СЖ является одним из симптомов воспалительного процесса, а контроль над ним позволяет отслеживать динамику этого процесса. Нами для определения концентрации белка в СЖ были использованы интенсивности полос поглощения при 1542 и 1649 см⁻¹. Так, для полосы 1542 см⁻¹ в диапазоне содержания лизоцима от 5 до 20 г/л наблюдается линейная зависимость $S = (0.53 \pm 0.05) + (2.67 \pm 0.70)P$ при $P = 0.95$, коэффициент корреляции $R = 0.9917$; а для полосы 1649 см⁻¹, соответственно, $S = (0.99 \pm 0.06)C + (2.66 \pm 0.85)P$ при $P = 0.95$, $R = 0.9960$. В качестве примера, в табл. 1 даны результаты анализа ИК-спектров проб на общее содержание белка СЖ трех пациентов с разными диагнозами, взятых на 2-й день госпитализации.

Информативными в офтальмологической диагностике оказались величины относительных оптических плотностей (S_i/S_{ct}) , где S_{ct} — площадь полосы сравнения; S_1 — площадь при 1259—1270 см⁻¹, S_2 — при 1400—1403 см⁻¹, S_3 — 1542—1545 см⁻¹, S_4 — 1646—1652 см⁻¹. В качестве стандартной выбрали полосу со средней интенсивностью при 1446—1452 см⁻¹. Для количественного сравнения ИК-спектров СЖ пациента с усредненной контрольной пробой СЖ здоровых лиц использовали нормализованные соотношения $(S_i/S_{ct})_j / (S_i/S_{ct})_k$, где $(S_i/S_{ct})_j$ — результат измерения i -той спектральной полосы для j -го пациента, $(S_i/S_{ct})_k$ — усредненная относительная интенсивность для i -той спектральной полосы в контрольной пробе (табл. 2).

Характер ИК-спектров СЖ отражает тяжесть клинического течения заболевания. Так, при острых заболеваниях соотношения площадей пиков S_4/S_{ct} возрастает в 2—2,2 раза по сравнению с кон-

Таблица 1
Общее содержание белков в СЖ по данным ИК-спектроскопии для разных категорий заболеваний в острой стадии

Клинические примеры	Общее содержание белка, г/л
Офтальмологически здоровый (мужчина 37 лет)	5.6
Больной вирусным кератитом (женщина, 45 лет)	7.0
Больной с глаукомой, осложненной язвой роговицы (женщина, 66 лет)	15.5
Больной с гнойной язвой роговицы (мужчина, 68 лет)	16.2

Таблица 2
Усредненные величины S_i и S_i/S_{cm} характеристических полос поглощения СЖ

Характеристическая полоса, см ⁻¹	1259	1403	1452	1548	1649
S_i	S_1	S_2	$S_3 (S_{cm})$	S_4	S_5
для контрольной группы здоровых лиц					
S_i	1.47	1.31	2.03	3.8	8.2
$(S_i/S_{cm})_k$	0.72	0.65	1.00	1.87	4.04
для пациента с вирусным кератитом (женщина, 45 лет)					
S_i	1.32	1.01	1.12	3.28	9.59
$(S_i/S_{cm})_j$	1.18	0.90	1	2.93	8.56
$(S_i/S_{cm})_j/(S_i/S_{cm})_k$	1.63	1.40	1.00	1.56	2.12
для пациента с гнойной язвой роговицы (мужчина, 68 лет)					
S_i	1.73	2.74	2.92	10.81	18.72
$(S_i/S_{cm})_j$	0.59	0.94	1.00	3.70	6.41
$(S_i/S_{cm})_j/(S_i/S_{cm})_k$	0.82	1.45	1.00	1.98	1.59
для пациента с глаукомой, осложненной гнойной язвой роговицы (женщина, 66 лет)					
S_i	2.61	4.03	3.32	13.32	18.06
$(S_i/S_{cm})_j$	0.79	1.21	1.00	4.01	5.44
$(S_i/S_{cm})_j/(S_i/S_{cm})_k$	1.09	1.88	1.00	2.14	1.35

тролем, S_2/S_{ct} — в 1,5—2 раза, а соотношение S_1/S_{ct} , напротив, уменьшаются на 20—25 %. Результаты анализа проб СЖ указаны в табл. 2.

Изменения соотношения площадей характеристических пиков S_i/S_{ct} позволяют проследить динамику заболевания, так как они в той или иной степени коррелируют с состоянием здоровья пациентов и при успешном лечении стремятся к значениям в контрольной группе здоровых лиц. В течение курса лечения соотношения площадей пиков изменяется немонотонно, максимальные изменения происходят в первые 4—5 дней, затем в течение 10—12 дней наблюдается стабилизация спектральных характеристик.

Как видно из рис. 1 изменения характеристических полос S_i/S_{ct} при наличии гнойной язвы ро-

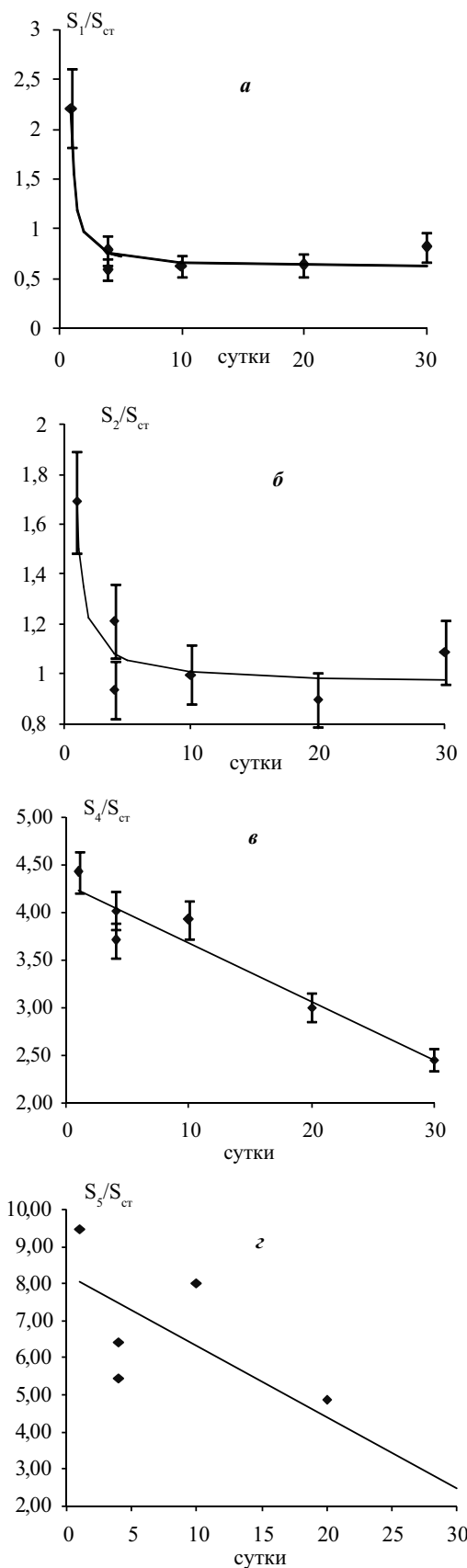


Рис. 1. Динамика изменения соотношения площадей пиков характеристических полос S_i/S_{ct} от времени при гнойной язве: а — S_1/S_{ct} ; б — S_2/S_{ct} ; в — S_4/S_{ct} ; з — S_5/S_{ct}

говицы хорошо коррелируют с состоянием здоровья пациентов. В зависимости от продолжительности лечения величины S_1/S_{ct} и S_2/S_{ct} стремятся к значениям в контрольной группе. Причем интенсивность этих характеристических полос изменяется немонотонно, принимая вид кривых «насыщения». Максимальные изменения происходят в первые 5 дней, и кривая выходит на плато в течение 10 дней. Наиболее простой рациональной функцией адекватно описывающей динамику изменения указанных спектральных характеристик является функция

$$y = ax/(b + x), \quad (1)$$

где $y = S_i/S_{ct}$, x — время лечения в сутках, a и b — эмпирические коэффициенты (табл. 3). Неадекватность изменений S_4/S_{ct} и S_5/S_{ct} от времени лечения, а значит и здоровья пациента, выражена не так четко. Вместе с тем обратно пропорциональные корреляции S_4/S_{ct} и S_5/S_{ct} от времени значимы и могут быть выражены простым линейным уравнением (табл. 3).

$$y = a + bx \quad (2)$$

Разный характер зависимостей S_i/S_{ct} от времени косвенно указывает на изменение фракционного состава белков, содержащихся в слезной жидкости на разных стадиях лечения и в контрольной группе.

Рассмотрим результаты ИК-спектрофотометрических исследований больных вирусным кератитом (герпес) роговицы. Из рис. 2 следует, что изменения характеристических полос S_i/S_{ct} при вирусном кератите имеют свои особенности. За исключением величин S_5/S_{ct} , разница между острой фазой и стадией исхода выражена слабее, нелинейные корреляции типа (1) также менее тесные (больше величина дисперсии и ниже значение коэффициента парной корреляции), чем в случае гнойной язвы (табл. 4). В то время при наличии вирусного кератита отношение S_5/S_{ct} с высокой степенью аппроксимации описывается уравнением (2). Это указывает на то, что при вирусной инфекции и хроническом характере заболевания состав белковых фракций меньше отличается от состава в контрольной группе, и его изменения происходят иначе, чем при микробной инфекции.

Для нейротрофического кератита картина изменения ИК-спектральных характеристик отличается от динамики, наблюдаемой при кератите, вызванном герпесом (вирусная инфекция) и гнойной язвой (рис. 3, табл. 5). Нормализация белкового состава, если судить по изменениям S_i/S_{ct} происходит также за 5—10 дней, однако все соотношения S_i/S_{ct} имеют четко нелинейный характер и адекватно описываются уравнением (1). Следует отметить, что в случае хронического нейротрофи-

Таблица 3

Параметры корреляционных уравнений (1) и (2), характеризующих динамику изменений при протекании гнойной язвы роговицы, $n = 6$, $P = 0,95$

Спектральный параметр	Тип тренда	a	b	Дисперсия, S	Коэффициент парной корреляции, R
S_1/S_{ct}	(1)	0,620	-0,719	0,126	0,983
S_2/S_{ct}	(1)	0,966	-0,428	0,110	0,932
S_4/S_{ct}	(2)	4,29	-0,062	0,234	0,957
S_5/S_{ct}	(2)	8,23	-0,191	1,626	0,830

Таблица 4

Параметры корреляционных уравнений (1) и (2), характеризующих динамику изменений при протекании вирусного кератита роговицы, $n = 5$, $P = 0,95$

Спектральный параметр	Тип тренда	a	b	Дисперсия, S	Коэффициент парной корреляции, R
S_1/S_{ct}	(1)	0,742	-0,841	0,173	0,685
S_2/S_{ct}	(1)	0,858	-1,581	0,330	0,857
S_4/S_{ct}	(1)	2,263	-0,426	0,275	0,594
S_5/S_{ct}	(2)	5,691	-0,130	0,480	0,962

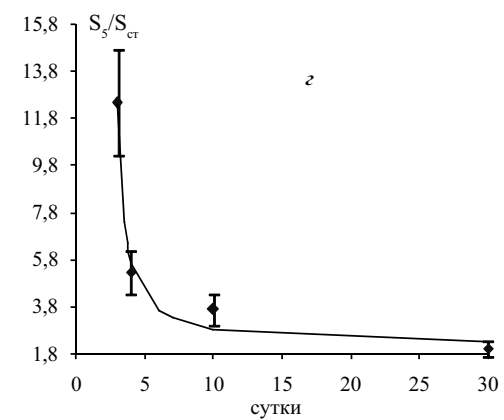
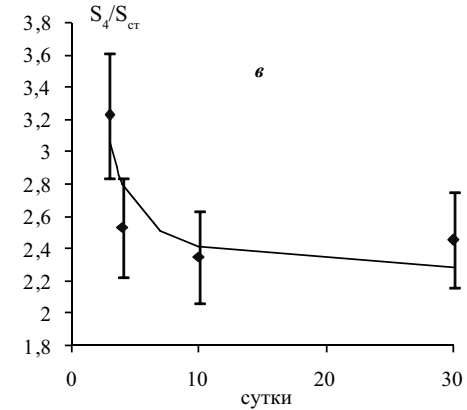
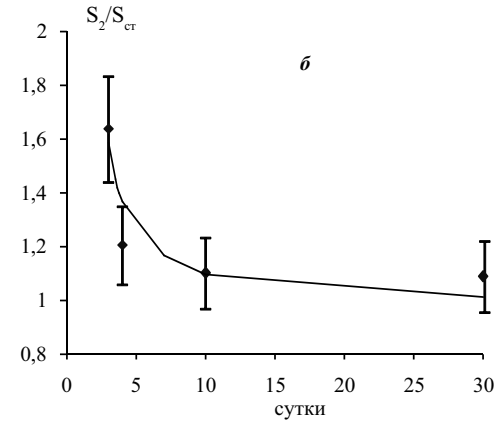
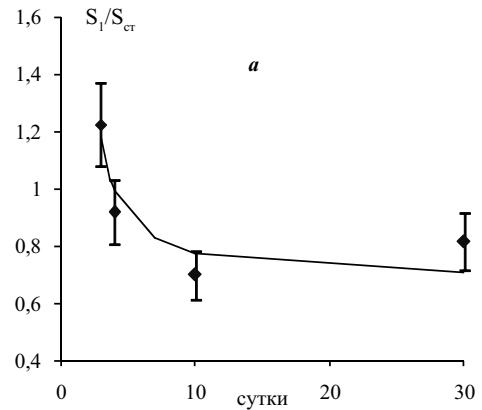
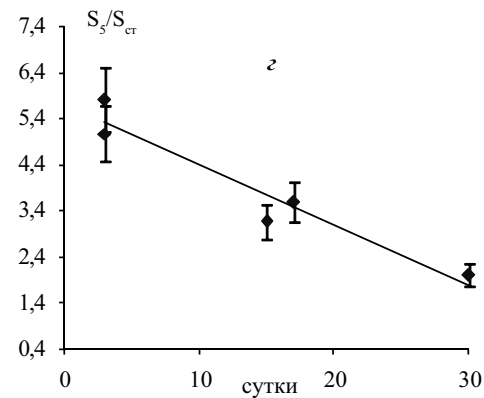
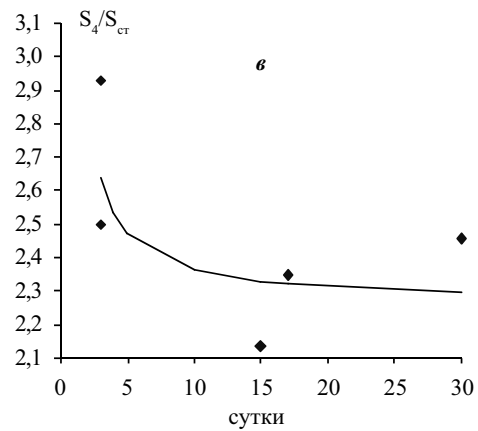
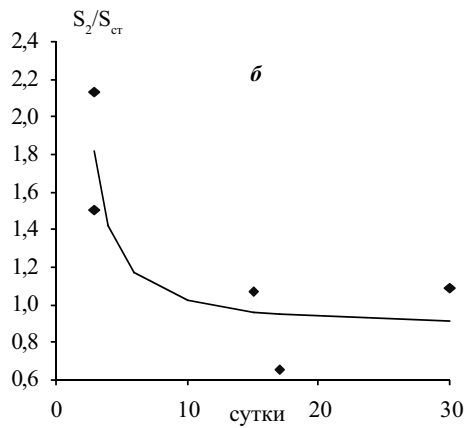
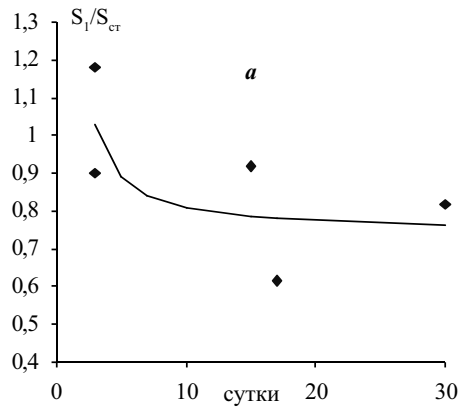


Рис. 2. Динамика изменения соотношения площадей пиков характеристических полос $S_i/S_{ст}$ от времени при вирусном кератите: а — $S_1/S_{ст}$; б — $S_2/S_{ст}$; в — $S_4/S_{ст}$; г — $S_5/S_{ст}$

Рис. 3. Динамика изменения соотношения площадей пиков характеристических полос $S_i/S_{ст}$ от времени при нейротрофическом кератите: а — $S_1/S_{ст}$; б — $S_2/S_{ст}$; в — $S_4/S_{ст}$; г — $S_5/S_{ст}$

Параметры корреляционных уравнений (1), характеризующих динамику изменений при протекании нейротрофического кератита роговицы, $n = 4$, $P = 0,95$

Спектральный параметр	a	b	Дисперсия, S	Коэффициент парной корреляции, R
$S_1/S_{ст}$	0,676	-1,286	0,116	0,909
$S_2/S_{ст}$	0,971	-1,161	0,139	0,909
$S_4/S_{ст}$	2,218	-0,827	0,257	0,851
$S_5/S_{ст}$	2,132	-2,484	0,692	0,992

ческого кератита отношения $S_i/S_{ст}$ близки к отношениям в контрольной группе.

Таким образом, наши исследования показали, что в острой стадии заболевания содержание общего белка в СЖ обычно в 2.5—3 раза выше, чем у здоровых людей, а в случае хронических заболеваний и вирусного кератита различия ИК-спектров СЖ для острой стадии и стадии исхода выражены слабее, чем в случае гнойной язвы.

Предварительные исследования СЖ больных с травмами глаза показали, что характер ИК-спектров СЖ из-за наличия белков крови заметно отличается от других изученных нами клинических примеров.

Результаты работы позволяют заключить, что анализ ИК-спектров СЖ по разработанной методике предоставляет хорошие возможности для современной диагностики и прогнозирования течения патологического процесса в роговице.

Авторы выражают благодарность проф. Семенову В. Ф. и проф. Полянскому К. К. за ценные советы при получении и обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вэндер Д. Ф., Голт Д. А. Секреты офтальмологии. М.: «Медпресс-информ», 2005. 462 с.
2. Шабалин В. Н., Шатохина С. Н., Девяткин А. А., Малов В. М., Ерошевская Е. Б., Малов И. В. Морфология жидких сред глаза. М.: «Медицина», 2004. 244 с.
3. Щербаков С. Я., Полянская Н. К., Рудаков О. Б. Современный способ диагностики заболеваний роговицы и прогнозирование результатов лечения — инфракрасная спектроскопия слезной жидкости // Системный анализ и управление в биомедицинских системах, 2007, Т.6, №3, с.658—660.
4. Щербаков С. Я., Полянская Н. К., Рудаков О. Б., Карнов С. И., Рудакова Л. В. Способ диагностики заболеваний роговицы. Патент РФ № 23244183.

Рудаков Олег Борисович — профессор, заведующий кафедрой химии Воронежского государственного архитектурно-строительного университета; тел.: (4732) 369350, e-mail: robi@vmail.ru

Полянская Наталья Константиновна — зав. отделением Воронежской областной клинической офтальмологической больницы; тел.: (4732) 369350

Байдичева Ольга Валентиновна — аспирант кафедры химии Воронежского государственного архитектурно-строительного университета; тел.: (4732) 534-386, e-mail: baidicheva@mail.ru,

Карнов Сергей Иванович — доцент кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета; тел. (4732) 208932

Рудакова Людмила Васильевна — доцент кафедры фармацевтической химии Воронежской государственной медицинской академии; тел.: (4732) 369350

Rudakov Oleg B. — professor, head of the chair of chemistry, Voronezh State University of Architecture and Civil Engineering; tel.: (4732) 369350, e-mail: robi@vmail.ru

Poljanskaja Natalia C. — head of department Voronezh regional clinical ophthalmologic hospital; tel.: (4732) 369350

Baidicheva Olga V. — the post-graduate student of chair of chemistry in Voronezh State University of Architecture and Civil Engineering; tel.: (4732) 534386, e-mail: baidicheva@mail.ru

Карнов Сергей Иванович — associate-Professor of chair of analytical chemistry, Voronezh State University; tel.: (4732) 208828

Rudakova Lyudmila V. — associate-Professor professor of chair of pharmaceutical chemistry, Voronezh State Medical Academy; tel.: (4732) 369350