МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И МЕДИЦИНСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

НЕИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АДАПТАЦИОННОГО СТАТУСА В ДИАГНОСТИКЕ ДОНОЗОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ОРГАНИЗМА ПРИ АНТРОПОГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

№ 94/255

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

1995

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И МЕДИЦИНСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

Начальник Управления научных
исследований О.Е.Нифантьев

03.08.1995 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра А.Д.Царегородцев

03.08.1995 г.

НЕИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АДАПТАЦИОННОГО СТАТУСА В ДИАГНОСТИКЕ ДОНОЗОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ОРГАНИЗМА ПРИ АНТРОПОГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Методические рекомендации
№ 94/255

Санкт-Петербург
1995

Методические рекомендации содержат описание неинвазивных высокочувствительных и информативных иммунологических, биохимических и цитологических методов исследования системы неспецифической резистентности организма, позволяющих осуществлять диагностику донозологических состояний и оценивать влияние антропогенных загрязнителей на растущий организм. Приведены величины показателей ведущих защитно-приспособительных реакций организма, полученные в результате апробации описанных методов на больших контингентах детей дошкольного возраста, проживающих в условиях антропогенных загрязнителей разной интенсивности.

Издание предназначено для специалистов практического здравоохранения и научных учреждений, осуществляющих скрининговые обследования населения с целью интегральной оценки и прогнозирования здоровья человека в разных условиях жизнедеятельности.

Методические рекомендации подготовлены сотрудниками Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им.И.И.Мечникова В.Г.Маймуловым, В.Г.Тимофеевым, О.И.Пересыпкиным, В.А.Дадали, Г.А.Баскович, И.Н.Макаровой, Н.Н.Киселевой, В.В.Галушко, Н.П.Кандыбором, В.С.Лучкевичем, Л.Б.Гайковой, О.И.Ивановой, Т.С.Чернякиной, А.В.Леванчуком, А.В.Суворовой.

© Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им.И.И.Мечникова, 1995

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в связи с ухудшением экологической обстановки и здоровья населения страны, особенно детского, возникла необходимость в массовом изучении иммунологического и биохимического статуса с целью раннего выявления нарушений адаптационных возможностей организма.

Наш многолетний опыт исследований показывает, что наиболее пригодными для этих целей являются показатели неспецифической резистентности организма. В результате обследования больших контингентов детей отобран комплекс неинвазивных, информативных и чувствительных методов изучения ведущих звеньев системы неспецифической защиты организма: антимикробной, антитоксической, антирадикальной и других, позволяющих оценить на донозологическом уровне степень неблагоприятного воздействия средовых факторов антропогенного происхождения.

Впервые при проведении массовых медико-биологических обследований по комплексу биохимических и иммунологических показателей рекомендуется использование слюны в отличие от традиционного материала - крови. Изложены методы оценки неспецифической иммунологической резистентности, основанные на изучении функций кожи и слизистых.

Рекомендуемые методы неинвазивны, поэтому для их использования нет противопоказаний.

В известные унифицированные методики нами внесены технические изменения, позволившие их упростить, повысить точность, информативность и адаптировать для работы с таким нетрадиционным материалом, как слюна. Методы характеризуются простотой технического выполнения, не требуют дефицитных реактивов и приборов, высокой квалификации исследователя. Они атравматичны, эпидемически безопасны, быстро выполнимы и позволяют проводить массовые скрининговые обследования больших контингентов населения разного возраста в любых условиях (стационарно, а также при выездах в учреждения).

Предлагаемые методы неспецифичны и выявляют нарушения, возникающие не только при воздействии неблагоприятных средовых факторов, но и при патологических состояниях. Поэтому для установления причинно-следственных связей между выявляемыми нарушениями адаптационного статуса организма и действием средовых факторов необходимо включать в исследуемые контингенты только лиц $\overline{\text{I}}$ и $\overline{\text{II}}$ группы здоровья.

В рекомендациях приведены показатели иммунологического и биохимического статуса здоровых детей дошкольного возраста, позволяющие судить о степени варьирования их величин. В конкретных климатогеографических и эколого-гигиенических условиях с учетом особенностей контингентов следует устанавливать свои значения параметров нормы.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Метод определения нормальной микрофлоры и кожи

Принцип метода: количественный и качественный учет микроорганизмов, вырастающих на поверхностях дифференциально-диагностических питательных сред, снятых с исследуемого участка кожи способом отпечатков (модифицированный метод Н.Н.Клемпарской, 1959).

Ингредиенты и принадлежности. Среды: Эндо, кровяной агар, желчно-солевой агар; бакпечатки (6 - на одного обследуемого); пипетки на 10 мл; флакон с 0,25% раствором нашатырного спирта, стерильные ватные тампоны на палочке, карандаш по стеклу, термостат.

Ход исследования. Накануне или в день исследования бакпечатки заполняют заранее приготовленными дифференциально-диагностическими средами (по две на каждую среду). Для определения микробной обсемененности поверхностного слоя кожи отпечатки делают с ладонной поверхности предплечья на три разные среды, плотно прижимая поверхность питательной среды к коже на 1-2 с.

Для определения глубокой микрофлоры с кожи этого участка через 1 мин после обработки тампоном, смоченным в стерильном 0,25% растворе нашатырного спирта, что усиливает секрецию желез и выход на поверхность глубокой микрофлоры, делают аналогичные отпечатки. Бакпечатки маркируют, инкубируют 18-20 ч при 37°С, учитывают результаты.

Учет и интерпретация результатов. После инкубации на каждой бакпечатке подсчитывают общее количество колоний, выделяемых с поверхностных и глубоких слоев кожи с оценкой их дифференциально-диагностических признаков. При необходимости микроорганизмы идентифицируют до вида.

Нарушение неспецифической резистентности характеризуется тремя основными признаками: значительным увеличением числа микроорганизмов в биотопе, появлением у них ферментов защиты и агрессии, появлением в биотопах не свойственных им микроорганизмов, обычно пред-

...телей кишечной флоры (например, кишечной палочки на коже).

Потенциометрический метод определения pH поверхности кожи

П р и н ц и п м е т о д а : электродная система pH-метра при контакте с увлажненной кожей развивает ЭДС, линейно зависящую от активности ионов водорода и температуры. Разность потенциалов переводится в pH и считывается с индикатора с точностью до 0,01.

Ингредиенты и принадлежности. Портативный с автономным питанием pH-метр ("pH-150"), электроды ЭСЛ-45-11 и ЭВЛ-1М4, нейтральный физиологический раствор хлорида натрия.

Ход исследования. Ручным компенсатором устанавливают температуру 25°С (до этой температуры в комнатных условиях нагреваются электроды при контакте с кожей). При этом ошибка измерения pH поверхности кожи не превышает допустимой погрешности прибора ±0,05. Электроды pH-метра смачивают физиологическим раствором комнатной температуры и прижимают к коже ладонной поверхности предплечья с образованием между электродами "мостика" из раствора контактной жидкости.

Учет и интерпретация результатов. Показания прибора снимают через минуту после начала измерения и установки постоянного pH на индикаторе прибора. Значение pH определяют в трех близлежащих точках кожи и высчитывают средний результат. Среднегрупповое значение pH кожи здоровых детей дошкольного возраста в экологически благополучных районах составляет 5,48 ± 0,004. В условиях химического загрязнения атмосферного воздуха среднее значение pH кожи составляет 5,73 ± 0,02. При повышении pH кожи возможно развитие гнойно-воспалительных заболеваний кожи и подкожной клетчатки.

Метод определения бактерицидной активности кожи (БАК)

П р и н ц и п м е т о д а : оценка самоочищающей способности кожи в отношении аллохтонного микроорганизма - кишечной палочки М-17 (колибактерин), искусственно наносимого на кожу (Клемпарская Н.Н., 1959). При этом учитывается число вырастающих колоний в момент нанесения кишечной палочки на кожу и через заданный промежуток времени (БАК выражается в виде процента погибших микроорганизмов).

Ингредиенты и принадлежности. Среда Эндо, бакпечатки однократного применения, пипетки на 10 мл, микропипетка, суточная бульонная культура кишечной палочки М-17 (можно использовать коммерческий биопрепарат колибактерин), стерильный физиологический раствор хлорида натрия, стерильные ватные тампоны на палочке, карандаш по стеклу, термостат.

Ход исследования. Накануне или в день исследования в бакпечатки наливают пипеткой среду Эндо. На кожу ладонной поверхности предплечья ватным тампоном равномерно наносят взвесь суточной бульонной культуры кишечной палочки, разведенной 1 : 50 000 физиологическим раствором (10 мл культуры на 500 мл физиологического раствора).

Сразу после нанесения бактерий и через 5 мин делают отпечатки с разных мест исследуемого участка кожи. Для этого среду бакпечатки плотно прижимают к поверхности кожи на 1-2 с. Бакпечатки надписывают, инкубируют 12-18 ч при 37°С.

Учет и интерпретация результатов. Подсчитывают количество колоний кишечной палочки (малиново-красного цвета с металлическим блеском) на обеих бакпечатках и высчитывают индекс бактерицидной активности - количество (%) погибших кишечных палочек через 5 мин после нанесения микробной взвеси на кожу по формуле:

$$ИБ = \frac{К_1 - К_2}{К_1} \cdot 100\%,$$

где ИБ - индекс бактерицидной активности кожи, $К_1$ - количество колоний кишечной палочки на первой бакпечатке, $К_2$ - количество колоний кишечной палочки на второй бакпечатке.

Индекс бактерицидной активности нормальной кожи здоровых детей через 5 мин составляет 80-96%. В экологически неблагополучных регионах ИБ резко изменяется. При проживании детей в условиях химического загрязнения атмосферного воздуха ИБ составляет 37-58%. В регионе с повышенным уровнем радиоактивного фона он повышается до 100%.

Цитологическое изучение состояния барьерной функции слизистой оболочки полости носа (риноцитоскопия)

Принцип метода: микроскопическое исследование окрашенных отпечатков со слизистой полости носа по составу и процентному соотношению клеточных элементов, характеризующих состояние слизистой (Колядицкая Е.А., 1947).

Ингредиенты и принадлежности. Предметные стекла для риноцитоскопии (пластинки из стекла 80 х 5 х 1,5 мм со шлифованными краями), тщательно вымытые и обезжиренные, фиксатор (метиловый спирт или ацетон), краска Романовского - Гимзы, микроскоп биологический иммерсионный.

Ход исследования. Под контролем зрения при помощи носового расширителя и лобного рефлектора предметное стекло осторожно вводят в носовую полость, общий носовой ход, плотно прижимают к нижней носовой раковине, быстро извлекают. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют 10 мин, окрашивают по Романовскому - Гимзе и микроскопируют.

Учет и интерпретация результатов. Основные клетки в мазках-отпечатках здорового ребенка представлены палочко- и сегментноядерными нейтрофилами и эпителиальными клетками. Оценка проводится по степени дистрофических изменений клеток (пикноз, лизис, набухание ядер), по характеру их расположения (единичные, многочисленные, группы или пласты клеток), по виду эпителиальных клеток (плоские, мерцательные, вставочные), по наличию эозинофилов и тучных клеток.

Подсчет эпителиальных клеток и гранулоцитов ведется со следующим обозначением: (±) - единичные клетки, редкие в полях зрения; (+) - единичные клетки, частые в полях зрения, редко - небольшие их группы; (++) - многочисленные отдельные клетки и часто небольшие их группы; (+++) - часто встречающиеся пласты клеток. Определяют процентное соотношение нейтрофильных гранулоцитов и эпителиальных клеток.

Нормальный отпечаток здорового человека: единичные поле зрения лейкоциты и эпителиальные клетки (преимущественно плоскоклеточные эпителиальные), качественная оценка клеток - (±, реже +); соотношение нейтрофилов и эпителиальных клеток соответственно 80-100% и 0-20%. Эозинофилы - единичные на весь препарат (от 0 до 5). Клетки с признаками дистрофических изменений отсутствуют либо встречаются в единичном количестве. Эозинофилы встречаются у 60% обследуемых с аллергическими ринопатиями химической этиологии. Единичные тучные клетки обнаруживаются при полинозах.

Метод определения секреторного иммуноглобулина А в слюне

Принцип метода. Взаимодействие секреторного иммуноглобулина, радиально диффундирующего из лунки в агаровый гель,

с гомологичной антисывороткой приводит к образованию в местах встречи специфического преципитата в виде кольца, диаметр которого пропорционален концентрации иммуноглобулина. Его количество определяют относительно стандарта с известной концентрацией секреторного иммуноглобулина А (Манчини, 1963).

Ингредиенты и принадлежности. Исследуемый материал в виде слюны, отобранной и подготовленной по изложенному в соответствующем разделе способу, коммерческий набор для определения секреторного иммуноглобулина А (предприятие по производству бактерийных препаратов ЦНИИВС им.И.И.Мечникова), веронал, мединал, хлорид натрия, хлорид магния, хлорид кальция, агароза (агар Дифко или любой другой аналогичного качества и степени очистки), чашки Петри разового использования, диаметром 90 мм, пробирки, пипетки на I и 5 мл, игла-пробойник диаметром 2 мм, микропипетки (для взятия дозы 2 мкл), водяная баня, термостат, миллиметровая бумага для построения калибровочного графика, измерительная линейка фирм "Беринговерке" (можно использовать штанген-циркуль с точностью измерения 0,I мм), столик с регулируемой горизонтальной поверхностью.

Ход исследования. Ход исследования регламентирован Наставлением по применению коммерческого набора препаратов для определения секреторного иммуноглобулина А. Поэтому освещаются некоторые моменты, требующие пояснений. Рекомендуем состав мединал-вероналового буфера pH 8,6, дающий оптимальные результаты при проведении радиальной иммунодиффузии и реакции иммуноэлектрофореза: хлорид натрия - I7 г, веронал - I,I5 г, мединал - I,75 г, хлорид кальция - 0,3 мл 1 М раствора, хлорид магния - I мл М раствора. Компоненты растворяют в 300 мл горячей дистиллированной воды, после охлаждения доводят объем раствора до 400 мл. Буфер хранят при температуре 4^{0}С в течение месяца. В день опыта к одной части буфера добавляют 4 части дистиллированной воды. Рабочий раствор используют в течение I2 ч. Смесь агара с преципитирующей антисекреторной сывороткой можно заливать в горизонтально установленные чашки Петри разового пользования. Полистироловые чашки обладают гидрофобностью, что предупреждает подтекание испытуемого материала под пластинку агара и не требует изготовления подложки. При постановке реакции образуются четкие зоны преципитации, не требующие дополнительного контрастного окрашивания.

Учет и интерпретация результатов. Результат учитывается по построенной калибровочной кривой относительно стандартного препарата.

Для стандартизации расчета показателя содержания секреторного

иммуноглобулина рекомендуется использовать формулу:

$$C_x = C : P \cdot (d_x^2 - d_p^2) : (d^2 - d_p^2) \cdot (P - 1) + 1,$$

где C_x - концентрация иммуноглобулина в исследуемом материале, C - концентрация иммуноглобулина в неразведенной сыворотке, P - степень разведения стандартной сыворотки, d_x - диаметр кольца преципитации исследуемого образца, d - диаметр зоны преципитации стандартной сыворотки, d_p - диаметр зоны преципитации разведенной стандартной сыворотки. Исключение графического метода позволяет стандартизировать определение, повысив его надежность и точность.

Содержание секреторного иммуноглобулина А зависит от региона, где проводятся исследования. У детей дошкольного возраста, проживающих на юге Гомельской области, количество секреторного иммуноглобулина А в слюне составляет 0,042 мг/мл, в Смоленской области (запад России) - 0,05 мг/мл, в Санкт-Петербурге - 0,06 мг/мл, на юге Астраханской области - 0,09 мг/мл. Проявляется закономерность климато-географической зависимости показателя: чем севернее и континентальнее регион, тем больше секреторного иммуноглобулина А в слюне. При химическом загрязнении атмосферного воздуха значение показателей разнонаправлено (повышение или понижение, сочетанное с увеличением среднегрупповых показателей заболеваемости ОРЗ). По данным литературы, концентрации секреторного иммуноглобулина А в слюне составляют 0,03-0,15 мг/мл.

Полуколичественный ти рационный метод определения активности лизоцима в слюне

П р и н ц и п м е т о д а заключается в способности лизоцима растворять индикаторный микроорганизм микрококк (*Micrococcus lysodeticus* № 2665). Активность лизоцима выражают его титром - наибольшим разведением, вызывающим лизис тест-культуры (Алексеева О.Г. Клемпарская Н.Н., 1959).

Ингредиенты и принадлежности. Исследуемая жидкость (слюна), 0,1 М фосфатный буфер, pH 6,2, приготовленный на 0,5% растворе хлористого натрия (ФБР), суточная агаровая культура микрококка (или ацетоновый порошок культуры), оптический стандарт мутности на 10 ед., пробирки бактериологические, пипетки на 1 и 5 мл, штативы, термостат.

Вместо культуры микрококка можно использовать коммерческий или самостоятельно приготовленный ацетоновый порошок. Для этого культу-

ру выращивают на питательном агаре 48 ч при 37°С, смывают физиологическим раствором, фильтруют через слой ваты, трижды отмывают дистиллированной водой и четыре раза ацетоном на холоде, высушивают при комнатной температуре. Полученный порошок можно длительно хранить в сухом месте при температуре 4-6°С.

Ход исследования. Слону разводят 1 : 20 ФБР и в ряду пробирок делают двойные ее разведения в объеме 0,5 мл до 1 : 40960. При исследовании большого числа проб предельное разведение определяется опытно, предварительным титрованием. Во все пробирки добавляют равный объем двухмиллиардной взвеси суточной агаровой культуры или порошка *микрококка* в ФБР. В качестве *контроля* используют пробирку с 0,5 мл взвеси микрококка и 0,5 мл ФБР. Пробирки встряхивают и выдерживают 3 ч при 37°С в термостате.

Учет и интерпретация результатов. Учет реакции производится по последней пробирке ряда, в которой наблюдается лизис тест-культуры при сравнении с контрольной и выражается в виде титра - максимального разведения слюны, давшего феномен лизиса.

Среднегеометрическое значение титров лизоцима у здоровых детей в экологически благополучных регионах 1 : 20000 - 1 : 30000. В промышленных центрах, в районах с загрязненным атмосферным воздухом значение титров лизоцима 1 : 5000 - 1 : 7000.

Количественный турбидиметрический метод определения активности лизоцима в слюне

Принцип метода: турбидиметрическое измерение степени светопропускания микробной взвеси микрококка до и после контакта с лизоцимом исследуемого материала (Каграмова К.А., Ермольева З.В., 1966).

Ингредиенты и принадлежности. Исследуемый материал, кристаллический лизоцим (коммерческий препарат), фосфатный буферный раствор, pH 6,2 (ФБР), суточная агаровая культура или порошок микрококка, вата гигроскопическая, фильтровальная бумага, пробирки бактериологические, пипетки бактериологические на 1 и 5 мл, штативы, воронки стеклянные, термостат, фотоэлектроколориметр, работающий в режиме турбидиметрического учета и имеющий в комплекте зеленый светофильтр (длина волны 540 нм).

Ход исследования. Для количественного определения лизоцима строят калибровочную кривую, исходя из концентрации фермента 2, 4, 6, 8 мкг в пробе (бо́льшие и меньшие концентрации лизоцима брать нецелесообразно), используя стандартный раствор кристаллического

лизоцима, который может храниться длительное время в запаянных ампулах в замороженном состоянии. Из него готовят исходный раствор лизоцима (8 мкг/мл).

Для приготовления микробной взвеси суточную агаровую культуру микрококка смывают ФБР, фильтруют через слой ваты, стандартизируют на ФЭК с зеленым светофильтром (длина волны 540 нм). Сухой порошок растворяют в ФБР и стандартизируют на ФЭК. Оптическая плотность взвеси должна быть 0,6-0,7.

Для построения калибровочной кривой берут 10 пробирок: 1 и 2 - контроль без лизоцима (1 мл ФБР), 3 и 4 - 2 мкг/мл лизоцима (0,25 мл исходного раствора лизоцима + 0,75 мл ФБР), 5 и 6 - 4 мкг/мл лизоцима (0,5 мл исходного раствора лизоцима + 0,5 мл ФБР), 7 и 8 - 6 мкг/мл лизоцима (0,75 мл исходного раствора лизоцима + 0,25 мл ФБР), 9 и 10 - 8 мкг/мл лизоцима (1 мл исходного раствора лизоцима).

В каждую пробирку с интервалом 30 с вносят по 6 мл суспензии микрококка. Сразу после приливания суспензии измеряют начальную оптическую плотность контрольных растворов, а через 30 мин инкубации при 37°С - конечную оптическую плотность опытных, начиная с первого и делая последующее измерение через 30 с после предыдущего. По полученным результатам измерений строят калибровочную кривую.

Для определения лизоцима в слюне ее разводят 1 : 10 ФБР. К 1 мл разведения прибавляют 6 мл суспензии микрококка. Дальнейшее исследование проводят как изложено выше. Полученный результат оптической плотности согласно калибровочной кривой выражают в мкг/мл слюны.

При определении лизоцима необходимо строго выдерживать pH среды, температурный и экспозиционный режимы, точно дозировать ингредиенты, пользоваться химически чистой посудой.

Учет и интерпретация результатов. У здоровых детей в экологически благополучных регионах содержание лизоцима в слюне составляет 100-120 мкг/мл. В регионах с загрязненным атмосферным воздухом лизоцим слюны здоровых детей содержится в количестве 20-70 мкг/мл.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Метод проведения антипиринового теста

Принцип метода - спектрофотометрическое измерение 4-нитрозоантипирина, образующегося при взаимодействии антипирина с нитритом натрия в присутствии серной кислоты.

Реактивы: № 1 (100 г $Na_2SO_4 \cdot 2H_2O$ и 40 мл 6N H_2SO_4 в 1 л H_2O), № 2 (0,75 N NaOH), № 3 (1 N H_2SO_4), № 4 (0,2% $NaNO_2$).

Ход определения. Чистый антипирин (без наполнителя) принимают утром натощак в дозе I,5-2,0 мг на I кг массы тела (но не более I г), растворив в 0,5 стакана воды комнатной температуры. Слюну собирают через 2, 4, 6 ч и центрифугируют I5 мин при 3000 об/мин (осадок отбросить). К 2 мл отцентрифугированной слюны последовательно добавляют 2 мл реактива № I и 2 мл реактива № 2. Полученную смесь тщательно перемешивают и центрифугируют в течение I5 мин при 6000 об/мин. К 3 мл супернатанта добавляют 0,I мл реактива № 3 и 0,2 мл свежеприготовленного реактива № 4. Через 20 мин инкубации при 20°С измеряют оптическую плотность проб при λ 340 нм против контроля, состоящего из 3 мл H_2O, 0,I мл реактива № 3 и 0,2 реактива № 4. Количество антипирина (в мкг) находят по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой готовят раствор антипирина, содержащий 2 мг вещества в I00 мл 0,07 Н H_2SO_4. Для определения времени полувыведения антипирина строят график зависимости между натуральным логарифмом концентрации антипирина и временем взятия пробы (в часах).

Метод определения активности глутатион-S-трансферазы (Г-S-Т) в слюне

Принцип метода. Активность Г-S-Т определяют с помощью субстрата 1-Cℓ-2,4-динитробензола (ХДНБ) по накоплению продуктов реакции - конъюгата глутатиона с ХДНБ. Накопление продукта реакции сопровождается изменением оптической плотности реакционной смеси при λ 340 нм.

Реактивы: калий-фосфатный буфер 0,I М, pH 6,5; глутатион восстановленный (Г-S-H) 25 мМ раствор в 0,I М калий-фосфатном буфере, pH 6,5; ХДНБ I00 ммоль (растворяется в спирте при нагревании).

Ход определения. Определение активности производится в термостатированных кюветах при 25°С. В кювету последовательно вносят 2,72 мл калий-фосфатного буфера, 0,I2 мл восстановленного глутатиона, 0,I мл слюны и 0,06 мл ХДНБ и включают секундомер. Определение проводится через каждые 30 с в течение 3 мин. Снимают показания против контроля (3 мл калий-фосфатного буфера и 0,05 мл слюны) при λ 340 нм. Кроме того снимают показания в холостой пробе (в кювету вносят те же реактивы, только без слюны).

Расчет производится по формуле:

$$A = \frac{\Delta E \cdot 3 \cdot I0^3}{t \cdot K \cdot c \cdot b} \text{ ммоль/с·г белка,}$$

где ΔE - изменение оптической плотности за 3 мин ($E_{опыта} - E_{холостой\ пробы}$); 3 - объем раствора в кювете; t - время в секундах; К - коэффициент молярной экстинкции конъюгата глутатиона и ХДНБ, равный $9{,}6 \cdot 10^3 М^{-1} \cdot см^{-1}$; с - концентрация белка в пробе, V - объем слюны, взятый в пробу.

Метод определения активности Zn-, Cu-зависимой супероксиддисмутазы (СОД) в слюне

П р и н ц и п м е т о д а . Используется система, состоящая из рибофлавина и тетраметилэтилендиамина в фосфатном буфере, облучаемых лампой дневного света мощностью 20 Вт на расстоянии 20 см. Время облучения 5 мин. Образующийся в процессе облучения супероксидный радикал подвергается реакции дисмутации и конкурирующей реакции взаимодействия с пара-нитротетразолием хлористым (п-НТХ). В опытной пробе скорость ферментативной реакции дисмутации значительно превышает скорость восстановления п-НТХ, поэтому степень образования формазана низкая. В опытной пробе, где СОД ингибирована кипячением, скорость восстановления п-НТХ больше скорости спонтанной дисмутации O_2^-, в силу чего степень образования формазана высокая. В контроле на реактивы и эндогенное восстановление п-НТХ отсутствует тетраметилэтилендиамин, поэтому фотохимическая система продукции O_2^- не работает.

Реактивы: 0,5 мМ водный раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА); 0,05 М раствор тетраметилэтилендиамина (ТЭМЭД) на 0,5 мМ растворе ЭДТА (годен через 2 ч после приготовления, хранится в течение суток); 0,034 мМ водный раствор рибофлавина (хранится в течение рабочего дня в темной посуде) 0,85 мМ пара-нитротетразолий хлористый; К,Na-фосфатный буфер 0,I М, pH 7,8; К,Na-фосфатный буфер 0,05 М, pH 9,I; I0% водный раствор йодистого калия.

Ход определения.

Реактивы и проводимая процедура	Контрольная проба, мл	Опытная проба № I, мл	Опытная проба № 2, мл
Слюна	0,2	0,2	0,2
H_2O	3	2,5	2,5
Кипячение	-	I5 мин	-
Фосфатный буфер, pH 9,I	0,5	-	-
Фосфатный буфер, pH 7,8	-	0,5	0,5

Реактивы и проводимая процедура	Контрольная проба, мл	Опытная проба № 1, мл	Опытная проба № 2, мл
ТЭМЭД	-	0,5	0,5
п-НТХ	0,5	0,5	0,5
Рибофлавин	1,0	1,0	1,0
Облучение лампой дневного света	5 мин	5 мин	5 мин
Йодистый калий	0,5	0,5	0,5

Пробы фотометрируют при λ 490 нм.

Расчет реактивности СОД в процентах торможения образования формазана проводят по формуле:

$$\frac{E_{\text{СОД № 1}} - E_{\text{СОД № 2}}}{E_{\text{СОД № 1}} - E_{\text{контр.}}} \cdot 100\% \text{ (\% торможения).}$$

Условная единица активности СОД соответствует 50% торможения в пересчете на 1 с и 1 г белка в пробе.

Метод определения активности глутатионперок идазы (ГПО) в слюне

Реактивы: 0,1 М ТРИС-HCl, pH 7,4; ТРИС-HCl 0,1 М, pH 8,4; 0,05 мМ этиленциаминтетрауксусная кислота, натриевая соль (Na-ЭДТА), $4,9 \cdot 10^{-3}$ М азид натрия; 2 мМ глутатиона восстановленного в ТРИС-HCl, pH 7,4; 10 мМ раствор перекиси водорода; трихлоруксусная кислота 10% (ТХУ); реактив Эллмана 0,04% в 0,1% цитрате натрия.

Ход определения. В контрольные и опытные пробирки последовательно вносят 1,1 мл H_2O; 0,5 мл ТРИС-HCl, pH 7,4; 0,1 мл ЭДТА, 0,1 мл раствора азида натрия; 1 мл раствора восстановленного глутатиона; 0,2 мл слюны. Дополнительно в контрольные пробирки вносят 1,0 мл H_2O и помещают все пробирки в водяную баню при 37°С на 3 мин для преинкубации. В опытные пробы добавляют 1,0 мл раствора H_2O_2 и инкубируют 2 мин. Реакцию останавливают добавлением во все пробирки 1 мл ТХУ, и помещают пробы в лед на 5 мин. После фильтрования в пробирки вносят 1,0 мл фильтрата, 2,8 мл ТРИС-HCl, pH 8,4, 0,1 мл реактива Эллмана. Через 10 мин пробы фотометрируют при λ 412 нм.

Расчет активности: $A = \frac{\Delta E \cdot 6 \cdot 10^6}{t \cdot K \cdot c \cdot \vartheta}$ мкМ/с·г белка, где ΔE - разница в оптической плотности между контрольной и опытной пробами; 6 - разведение слюны; t - время инкубации проб в секундах; К - коэффициент молярной экстинкции, равный 11400 $М^{-1} \cdot см^{-1}$; с - концентрация белка в пробе; ϑ - объем слюны, взятой на определение.

Метод определения глутатионредуктазы (ГР) в слюне

П р и н ц и п м е т о д а : глутатионредуктаза катализирует реакцию восстановления окисленного глутатиона (ГS-SГ) по схеме:

$$ГS - SГ + НАДФН + H^+ \xrightarrow{ГР} 2Г - SH + НАДФ^+.$$

Уменьшение содержания НАДФН в пробе определяют спектрофотометрически при λ 340 нм.

Реактивы: 1 М ТРИС-HCℓ на 5 мМ ЭДТА, pH 8,0; 0,033 мМ глутатион окисленный (ГS-SГ); нейтрализованный NaOH до pH 7,C; 2 мМ НАДФН.

Ход определения. В пробирки последовательно вносят 0,I5 мл ТРИС-HCℓ, 2,2 мл H_2O, 0,2 мл слюны, взятой натощак, тщательно перемешивают и инкубируют на водяной бане при 37°С. Через I0 мин в опытные пробирки добавляют 0,I5 мл раствора НАДФН, спектрофотометрируют и помещают снова в водяную баню (37°С). Уменьшение оптической плотности измеряют через 30 мин. Снимают показания против контроля (0,I5 мл слюны + 2,85 мл H_2O). Контроль обрабатывают так же, как опытные пробы. Расчет производят по формуле:

$$A = \frac{\Delta E \cdot 3 \cdot 10^9}{K \cdot t \cdot c \cdot \vartheta} \text{ нмоль/с·г},$$

где ΔE - изменение оптической плотности ($E_{I0\ мин} - E_{30\ мин}$); 3 - объем раствора в кювете; К - коэффициент молярной экстинкции НАДФН, равный $6{,}22 \cdot 10^6\ М^{-I} \cdot см^{-I}$; t - время в секундах; с - содержание белка в пробе; ϑ - объем слюны в пробе.

Метод количественного определения общих сульфгидрильных и дисульфидных групп обратным амперометрическим титрованием

П р и н ц и п м е т о д а . Титрование растворов, содер-

жащих тиоловые группы, производят в присутствии избытка ионов серебра (Ag^+), которые с SH-группами образуют прочную меркаптидную связь по уравнению: $R - SH + Ag^+ \longrightarrow R - S - Ag + H^+$. Избыток ионов Ag^+ оттитровывается эквимолярным раствором унитиола. По полученным данным проводят соответствующий подсчет SH-групп в молекулах белка. Расщепление -S-S-групп сульфитом Na (Na_2SO_3) производят также в присутствии избытка ионов Ag^+. Образующиеся при восстановлении -S-S-групп -SH-группы связываются с ионами Ag^+ по уравнению: $R - S - S - R + Ag^+ + SO_3^{2-} \longrightarrow R - S - SO_3Ag + R - S - Ag$. Избыток ионов Ag^+ оттитровывается раствором унитиола.

Оборудование. Для обратного амперометрического титрования SH- и -S-S-групп используется установка с рабочим Pt-электродом и соответствующим электродом сравнения. Для перемешивания жидкостей в сосуде для титрования применяют магнитную мешалку.

Реактивы: 30% водный раствор KCℓ; 0,001 N водный раствор AgO_3; аммиачный буфер (0,2 М водный раствор аммиака и 0,2 М водный раствор азотнокислого аммония смешивают в соотношении 1:1); электролит (4,2 г KI и I,3 г HgI_2 в I00 мл 30% KCℓ); гель агаровый для заполнения мостика (3 г агара растворяют на водяной бане в I00 мл 25% KCℓ); $5 \cdot I0^{-4}$ М водный раствор унитиола.

Ход определения SH-групп. В сосуд для титрования вносят 50 мл аммиачного буфера и 0,I5 мл разведенной слюны (I:3), туда же погружают платиновый электрод и конец мостика, и включают магнитную мешалку. Пипеткой добавляют 0,5 мл раствора $AgNO_3$. После того, как стрелка прибора займет стабильное положение, начинают титрование, добавляя из пипетки по 0,05 мл унитиола и отмечая показания прибора. Для определения результатов титрования строят график, на оси ординат которого откладывают величину тока, возникающего в ходе титрования, а на оси абсцисс - соответствующие им величины объема добавленного унитиола. Две прямые, проходящие через полученные точки, пересекаются в конечной точке титрования. Учитывая, что I мл $5 \cdot I0^{-4}$ М раствора унитиола эквивалентен I мкМ SH-групп, производят расчет:

$$\text{К-во SH-групп} = \frac{\text{V раствора унитиола, затраченного на титрование} \cdot P}{\text{V раствора слюны, взятого на титрование}}$$

мкмоль/мл,

где V - объем, I - разведение.

Ход определения -S-S-групп. В сосуд для титрования, содержащий 50 мл аммиачного буфера, вносят 0,I5 мл разбавленной слюны (I:3);

0,5 мл раствора $AgNO_3$ и на кончике скальпеля сухого Na_2SO_3. После того, как стрелка прибора займет стабильное положение, начинают титрование раствором унитиола, добавляя его по 0,05 мл. После построения графика проводят расчет по формуле:

$$\text{К-во } S\text{-}S\text{-групп} = \frac{(E_{SH+SS} - E_{SH}) \cdot P}{2 \cdot V_{\text{пробы}}} \text{ мкмоль/мл},$$

где P - разведение; E - количество унитиола, затраченное на титрования; V - объем пробы (мл).

Примеры интерпретации биохимических параметров неспецифической резистентности организма

Приводим результаты обследования здоровых детей дошкольного возраста (5-7 лет), проживающих в 2 экологически неравноценных районах: крупного промышленного города и загородной зоны.

Показатели системы НРО у детей, проживающих в условно "чистом" районе, составляют: белок - $(22,0 \pm 2,8) \cdot 10^{-4}$ г/мл; активность ферментов Г-S-Т - I28,2 ± 0,2 мкмоль/с·г; СОД - 6,3 ± 0,3 ед.акт./с·г; ГПО - 852,9 ± 74 мкмоль/с·г; ГР - 0,054 ± 0,006 мкмоль/с·г. Содержание сульфгидрильных групп (-SH) - 4,3 ± 0,I мкмоль/мл, дисульфидных (SS) групп - I,75 ± 0,02 мкмоль/мл; тиолдисульфидный коэффициент - SH/SS - 2,5 ± 0,0I.

У детей, проживающих в экологически неблагоприятном районе, наблюдается смещение окислительно-восстановительного гомеостаза в сторону окисленных форм (SH/SS = 2,0 ± 0,08) в результате снижения тиоловых (SH = 3,8 ± 0,I мкмоль/мл) и нарастания дисульфидных (SS = I,9 ± 0,04 мкмоль/мл) групп. Падение восстановительного потенциала у этих детей может быть связано со снижением активности ГР до 0,037 ± 0,003 мкмоль/с·г - ведущего фермента, участвующего в регенерации восстановительных тиолов. Кроме того, судя по возрастанию активности ГПО до I0II,9 ± I0I,5 мкмоль/с·г, у детей в экологически неблагоприятном районе усиливаются процессы свободно радикального и перекисного окисления. Эти факты свидетельствуют о напряжении системы неспецифической защиты у детей и необходимости проведения у них оздоровительных мероприятий, направленных на коррекцию звеньев антиоксидантной и антирадикальной защиты.

Методика сбора, хранения и предварительная обработка слюны

Для иммунологических и биохимических исследований собирают смешанную слюну из полости рта утром натощак, прополоскав рот несколько раз водой. Перед забором слюны обследуемый для стимуляции слюноотделения жует парафин. Можно собирать слюну без стимуляции. У детей усиление слюноотделения можно вызвать рефлекторно, предложив им мысленно представить, что они едят кислые лимон, клюкву, яблоко. Чрезвычайно важно проконтролировать и проследить, чтобы дети не сосали десны, щеки! Это приведет к появлению в слюне посторонних материалов: крови, содержимого десневых карманов и т.д. Подобные пробы слюны следует исключать из дальнейшей обработки. Простым сливанием из полости рта испытуемый собирает слюну в чистые стеклянные флакончики с резиновой пробкой (пенициллиновые флакончики) Слюну собирают через 1-3 ч после приема пищи (для иммунологических исследований в объеме 2-3 мл). Флаконы закрывают резиновой пробкой и транспортируют (без специальных требований) в лабораторию. Полученный субстрат загрязнен большим количеством микроорганизмов, что создает условия деградации иммуноглобулинов, антител и других субстратов, которые могут тестироваться. Поэтому собранный материал центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин на холоде (+4°С). Иммуноглобулины, в частности секреторные, желательно определять сразу же. При невозможности постановки опытов в день обследования слюну сохраняют в замороженном состоянии при температуре от -6 до -20°С. Периодическое размораживание нежелательно. Нельзя хранить при комнатной температуре. При исследовании слюны на лизоцим условия те же, хранение слюны при этом может быть более продолжительным (до одного года). Тестирование материала проводится в соответствии с изложенными в рекомендациях методами.

Для биохимических исследований смешанную слюну собирают в количестве 3,5-4 мл. Транспортировать и хранить слюну для определения активности ферментов следует на холоде (+4°С) не более 5 ч. Слюна для определения тиолдисульфидного соотношения и антипиринового теста может храниться в замороженном состоянии в течение 5 сут.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемые неинвазивные методы определения адаптационного статуса организма при антропогенных воздействиях обладают высокой чувствительностью, простотой и апробированы при массовых обследова-

них детских контингентов и взрослого населения. Использование нетрадиционного материала - слюны для определения биохимических и иммунологических показателей неспецифической резистентности организма позволяет проводить массовые обследования в неблагоприятных санитарно-эпидемиологических условиях (опасность СПИДа, сывороточного гепатита и других инфекций) и отрицательного отношения населения к разного рода обследованиям в экспериментальных целях. Высокая чувствительность методов дает возможность при обследовании здоровых лиц выявить ранние изменения функционального состояния организма и разработать необходимые профилактические и коррекционные мероприятия.

ЛР № 020496

Подписано в печать 26.09.95. Заказ № . Формат бумаги 60x84/16. 1,25 усл.печ.л. Тираж 300 экз. Цена свободная.

Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им.И.И.Мечникова

195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47

Типография ТОО "Доверие"

gost.e-ecolog.ru