МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Вавилов Н.В.[1], Шилов Ю.И.[1, 2]

[1] ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, Пермь, Россия
[2] ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Введение. Одна из важнейших функций клеток системы мононуклеарных фагоцитов – удаление биологического «мусора», в частности окисленных белков (Garibaldi S. et al., 2017). Окислительная модификация белков (ОМБ) – одно из основных последствий протекания свободно-радикального окисления в живых системах, опосредованное воздействием активных форм кислорода и реактивных форм азота. ОМБ могут не только активировать процессы воспаления при атеросклерозе и хронических заболеваниях почек, но и регулировать дифференцировку макрофагов (Garibaldi S. et al., 2017). Для изучения этих механизмов нами модифицирован один из распространенных методов для определения ОМБ (Reznick A.Z., Packer L., 1994), который был адаптирован для современных планшетных спектрофотометров.

Цель. Усовершенствование метода оценки окислительной модификации белков и его адаптация для планшетных спектрофотометров.

Материалы и методы. Исследовали сыворотку периферической крови 10 практически здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 19 до 23 лет. Сущность модификации метода заключалась в пропорциональном уменьшении объемов реагентов, замене некоторых реактивов на сходные по физико-химическим свойствам. Так, этилацетат как растворитель гидрофобных соединений заменён на ацетон, 6М раствор гуанидина гидрохлорида как растворитель денатурированного белка – на 8М раствор мочевины. Концентрация соляной кислоты для растворения 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) снижена с 2,5М на 1М раствор, так как ДНФГ хорошо растворяется в 1М растворе соляной кислоты. Не проводили второе отмывание осадка 10% раствором ТХУ, так как уже после первого осаждения 20% раствором ТХУ осадок приобретает нужную консистенцию. Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного спектрофотометра (PowerWave BioTEK Instruments, Inc., USA) с кварцевым 96-луночным планшетом (black quartz microplate with 96 wells, Hellma, USA). В две микропробирки типа Эппендорф вносили по 200 мкл сыворотки крови. Далее в пробирку с опытной пробой добавляли 400 мкл 0,1М раствора ДНФГ, а в контрольную – 400 мкл растворителя ДНФГ (1М раствор HCl). Пробирки оставляли на 1 ч при комнатной температуре в темноте. Затем в каждую пробирку добавляли 600 мкл 20% раствора ТХУ (m/V). Пробы инкубировали в течение 10 мин на льду и центрифугировали в течение 10 мин для осаждения белковых преципитатов. Супернатант удаляли. Пробы трижды промывали 400 мкл раствора этанол/ацетон (1:1) (V/V) для удаления не связавшегося ДНФГ и примеси липидов. Осадок высушивали в течение 12-18 ч. Далее осадок растворяли в 400 мкл 8М раствора мочевины. Образовавшиеся 2,4–динитрофенилгидразоны (ДНФ) регистрировали при следующих длинах волн: при 370 нм – нейтральные кетон-ДНФ (кДНФн), при 430 нм – основные кетон-ДНФ (кДНФо) и при 530 нм – нейтральные альдегид-ДНФ (аДНФн). Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мг общего белка сыворотки, который определяли микробиуретовым методом. Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и t-критерия Стьюдента для парных данных.

Результаты. В ходе исследований установлено, что уровень кДНФн сыворотки крови здоровых доноров составляет 1,24±0,15 нмоль/мг белка, что соответствует результатам, полученным как в классическом варианте реакции, так и данным литературы. Уровень кДНФо составляет 0,74±0,11 нмоль/мг белка, а аДНФн – 0,37±0,07 нмоль/мг белка. Таким образом, суммарная концентрация окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров составляет 2,35±0,11 нмоль/мг белка. Выявлено, что на долю аДНФн приходится 16%, на долю кДНФо – 31,5%, на долю кДНФн – 52,5% окисленных белков. Соотношение окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров аДНФн:кДНФо:кДНФн составляет 1:2:3,3.

Заключение. Таким образом, результаты, полученные с помощью предложенной в настоящей работе модификации метода, соответствуют классическому варианту метода.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ

Жоголев К.Д., Журкин М.А., Рубова С.Р., Жоголев С.Д., Харитонов М.А., Сбойчаков В.Б., Клецко Л.И., Андреев В.А., Азаров И.И., Аминев Р.М., Котов С.С., Горенчук А.Н., Жоголев Д.К., Удальцов О.Е.

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

Цель. Определить частоту встречаемости агентов различной природы при внебольничных пневмониях у военнослужащих иммунологическими и молекулярно-генетическими методами.

Материалы и методы. Помимо классического бактериологического метода, с помощью которого в мокроте определяются агенты только бактериальной природы, применяли метод иммуноферментного анализа, позволяющий определять концентрацию антител к респираторным вирусам (аденовирусам, РС-вирусам, вирусам гриппа А и В) и атипичным возбудителям (микоплазмам, хламидиям, легионеллам) в сыворотке крови, а также применяли иммунохроматографические экспресс-тесты для выявления вирусных агентов из мокроты и молекулярно-генетический метод – полимеразную цепную реакцию (ПЦР), позволяющую выявлять в плазме крови и мокроте фрагменты ДНК/РНК (антигены) как классических, так и атипичных возбудителей и агентов вирусной природы. Обследовано 150 больных внебольничной пневмонией военнослужащих по призыву в возрасте 18-22 года.

Результаты. По обобщенным данным из возбудителей бактериальной природы преобладали пневмококки, обнаруженные у 24,1% больных пневмонией. Гемофильная палочка выявлена у 8,3 %, золотистый стафиллококк – у 6,5%, клебсиелла – у 3,7% больных. Из атипичных возбудителей часто выявлялись микоплазмы – в 21,3% случаев и в 2 раза реже – хламидии – в 10,2% случаев. Также были выявлены возбудители нозокомиальной инфекции: