

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ГНОЙНЫМ ОТИТОМ РАЗРУШАТЬ ПЕПТИДОГЛИКАН

Земко Виктория Юрьевна

студент 4 курса лечебного факультета Витебского государственного медицинского университета, Республика Беларусь, г. Витебск

Окулич Виталий Константинович

научный руководитель, канд. мед. наук, доц. кафедры микробиологии Витебского государственного медицинского университета, Республика Беларусь, г. Витебск

Для определения активности лизоцима и других ферментов, способных разрушать пептидогликан (ПГ) используется сложный биологический метод по разрушению *Micrococcus lysodeicticus*. С целью упрощения данной методики нами предложено использовать субстрат — пептидогликан, меченый Конго красным (ПМКК). Для выделения пептидогликана из грамотрицательных бактерий использовали *Escherichia coli* ATCC 25922. В качестве примера приводим определение активности ферментов, способных разрушать ПГ в сыворотке крови. При разрушении субстрата освобождается Конго красный, количество которого будет пропорционально количеству ПГ, измеряемому по соответствующей длине волны.

Актуальность. Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) представляют собой небольшие молекулы, построенные из аминокислот. Относительно крупные антимикробные белки, содержащие более 100 аминокислот, чаще всего представляют собой литические ферменты, белки, связывающие питательные вещества, или содержащие сайты, направленные против специфических микробных макромолекул. АМП имеют меньший размер и, как правило, действуют путем нарушения структуры или функции клеточной мембраны микроорганизмов. Они являются важной составляющей врожденной иммунной системы эукариот, которая обеспечивает защиту против патогенов. АМП эффективны против широкого спектра бактерий, грибов и вирусов.

В настоящее время охарактеризованы сотни АМП, которые выявляются в эпителиальных тканях, фагоцитирующих клетках и биологических жидкостях человека. Некоторые АМП синтезируются постоянно (конститутивно), синтез других индуцируется в ответ на инфекцию или воспаление.

Большинство АМП представлено катионными, гранулы-ассоциированными пептидами с аффинностью к компонентам микробной клеточной стенки, например пептидогликану [1]. Предложенный метод может быть использован в клинических лабораториях в целях определения активности ферментов, разрушающих муреин.

Цель: оценить активность ферментов сыворотки крови разрушать пептидогликан у пациентов с острым и хроническим гнойным отитом.

Материалы и методы исследования. Для исследования было взято 18 сывороток больных из оториноларингологического отделения и 18 сывороток доноров. Пациенты были распределены на 2 группы: 10 человек с острым гнойным отитом, 8 — с хроническим гнойным отитом. Пробы перед применением осаждали в течение 10 минут (10 тыс. об. / мин; центрифуга MICRO 120). Для постановки метода использовали пептидогликан, меченый 2 %-ым Конго красным (ПМК), сыворотку больного и 0,2 М солянокислый трис-буфер pH 7,4 так как у нейтрофильной эластазы оптимум pH. В один ряд эппендорфов вносили

последовательно: 300 мкл раствора ПМК и 100 мкл сыворотки крови. Во второй ряд эппендорфов — 300 мкл раствора ПМК и 100 мкл сыворотки крови, которую предварительно нагревали в течение часа при температуре 56°С для инактивации комплемента. Контролем служили пробы, содержащие трис-НСl буфер рН 7,4 в количестве 300 мкл и 100 мкл сыворотки крови.

Далее проводили инкубацию проб в термостате при $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов. Затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 10 минут (10 тыс об. / мин; MICRO 120) для осаждения оставшегося неразрушенного ПМК. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96-луночного полистиролового планшета. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм определяли оптическую плотность в лунках.

Результат выражался в оптических единицах и рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для пересчета полученных результатов в пикокаталы нами была использована формула, выведенная после построения калибровочного графика по разведенному Конго красному, в котором была отражена зависимость активности фермента от оптической плотности раствора, исходя из того, что при расщеплении 1 молекулы субстрата, в раствор переходит 1 молекула Конго красного.

$$Y = [-0,00117 + 0,0346 \times E_{\text{оп}}] \times 9,92$$

где: Y — искомый результат;

$E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Так как анализ распределения данных показал их непараметрическое распределение, статистическую обработку проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова, отличия считались достоверными при $p < 0,05$ [2; 3; 4].

Результаты и обсуждения. В результате исследования было установлено, что уровень активности ферментов, способных разрушать ПГ у пациентов с гнойным отитом оказался достоверно выше, чем у доноров (у пациентов с гнойным отитом Медиана=0,112 пкат, у доноров Медиана=0,087 пкат, $p=0,03$). После инактивации комплемента способность разрушать ПГ достоверно снижается (Медиана=0,076 пкат, $p=0,02$) [5]. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Активность ферментов, способных разрушать пептидогликан до и после инактивации комплемента у доноров и у пациентов с гнойно-воспалительной инфекцией

Группа	N	Медиана, пкат	Процентиль, пкат	Дост
Доноры	18	0,087	0,079-0,088	
Пациенты с инфекцией	18	0,112	0,085-0,136	
Пациенты с инфекцией после инактивации комплемента	18	0,076	0,047-0,099	

Выводы.

1. Разработана методика, позволяющая определить антимикробную активность сыворотки крови пациентов разрушать пептидогликан.
2. Получены достоверные различия в ферментативной активности сыворотки крови по ее способности разрушать пептидогликан между пациентами с гнойным отитом и донорами.
3. Установлено статистически значимое снижение способности сыворотки разрушать пептидогликан после инактивации комплемента.

Список литературы:

1. Алешина Г.М., Кокряков В.Н., Шамова О.В., Орлов Д.С. и др. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета. / Г.М. Алешина, В.Н. Кокряков, О.В. Шамова // Медицинский академический журнал. — 2010. — № 4. — С. 149—160.
2. Земко В.Ю. Ферменты, разрушающие пептидогликан, в диагностике гнойных отитов / В.Ю. Земко, О.Д. Кирилюк, В.К. Окулич // Актуальные вопросы современной медицины и фармации // Витебск, 2014 — № 66 — С. 145—146.
3. Земко В.Ю. Ферменты, разрушающие пептидогликан, в диагностике гнойно-воспалительных заболеваний / В.Ю. Земко, О.Д. Кирилюк, В.К. Окулич // Студенческая медицинская наука XXI века // Витебск, 2013 — № 13 — С. 231—232.
4. Окулич В.К. «Роль активности ферментов, разрушающих пептидогликан, в диагностике гнойно-воспалительной патологии» 69-ая научная сессия университета / В.К. Окулич, В.Ю. Земко, О.Д. Кирилюк // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации// Витебск, 2014 — № 69. — С. 17—18.
5. Ziamko V. Levels of enzyme activity of blood serum for the ability to destroy peptidoglycan in patients with purulent-inflammatory diseases / V. Ziamko, O. Kiriluk, V. Okulich // Regional European congress of biomedical laboratory science and the 4th Greek medical laboratory technologists conference "Technical advances and current practices" // Афины, 2013 — № 4 — С. 36.