

8,8 – 0,355±0,35 Пкат. При сравнении данных групп между собой достоверных отличий не получено.

Среднее значение БАПНА-амидазной активности сывороток для контрольной группы составило 2,11±0,65 пкат, для группы пациентов с инфекционной патологией – 3,55±1,03 пкат ( $p<0,01$ ). Средняя БАПНА-амидазная активность АЖ для опытной группы была ниже, чем в сыворотке, и составила 0,049 пкат. При делении пациенток на группы с маловодием и без данной патологии уровень БАПНА-амидазной активности сывороток крови в первой группе был достоверно ниже, чем во второй: 3,13±0,23 пкат и 4,35±0,39 пкат соответственно ( $p=0,002$ ). При сравнении БАПНА-амидазной активности сывороток крови у пациентов с маловодием (4,693±1,99 Пкат) и многоводием (2,699±1,44) достоверных отличий получено не было ( $p>0,05$ ).

#### **Выводы.**

1. Выявлено, что при беременности, отягощенной маловодием и многоводием, уровень нейтрофильной эластазной активности сывороток крови выше на 70%, чем у беременных без инфекционной патологии, что может служить маркером активности инфекционного процесса.

2. Установлено статистически значимое повы-

шение нейтрофильной эластазы в амниотической жидкости у беременных женщин с инфекционной патологией.

3. Обнаружено повышение уровня БАПНА-амидазной активности в сыворотке крови у беременных с инфекционной патологией, при этом более высокий уровень оказался в подгруппе пациенток с маловодием.

#### **Литература:**

1. Савченко, Т.Н. Цитокины и нейтрофильная эластаза при невынашивании беременности при генитальном кандидозе / Т.Н. Савченко, А.Л. Пухальский, Г.В. Шмарина, М.Х. Точиева // Рос. мед. журнал. – 2009. – №3. – С. 20–23.

2. Журнал микробиологии и биотехнологии ISSN 1017 – 7825, 2006. – Т. 16, №8. – С. 1320–24.

3. Методика определения активности эластазы в биологических жидкостях: инструкция на метод, рег. № 66 / Ю.Г. Савкина [и др.]. – 2011.

4. Окулич, В. К. Определение активности эластазы в биологических жидкостях / В.К. Окулич, А.В. Корнилов, Ю.Г. Савкина, С. А. Сенькович // Достижения фундам., клин. медицины и фармации. – 2012. – №67. – С. 100–101.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК КАК МАРКЕРА ЛОКАЛЬНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА**

*Коротина О.Л.*

*УО «Витебский государственный медицинский университет»*

**Актуальность.** Воспаление активирует распад тканей, в результате которого происходит высвобождение клеточной ДНК. Вследствие этого существует возможность оценки воспалительного процесса по уровню свободной ДНК, которая выходит из клеток при их разрушении.

Для определения ДНК в настоящее время предлагается обширный набор методов, основанных либо на поглощении растворов ДНК в УФ-области, либо на взаимодействии ДНК со специфическими красителями, чаще всего – флуоресцентными.

В последнем случае для выявления комплексов «ДНК-краситель» применяют прямую флуориметрию реакционной смеси, а также ПЦР-анализ в режиме реального времени, капиллярный электрофорез, гель-электрофорез, обращенно-фазовую ВЭЖХ и т.д. Однако вышеперечисленные методы, как правило, требуют дорогостоящего оборудования и реагентов; вследствие этого их использование затруднительно в обычной практике клинико-диагностических лабораторий.

Кроме того, хорошо известно, что основными клетками иммунной системы, участвующими в воспалительных и антимикробных реакциях, являются нейтрофильные гранулоциты. Недавно был описан новый механизм их антимикробного действия. Оказалось, что нейтрофилы после активации выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры – нейтрофильные внеклеточные ловушки. В их состав входит ДНК, гистоны,

а также различные белки и ферменты гранул. Поэтому можно предположить, что количество ДНК отражает активность нейтрофилов в тканевом воспалении.

Отсюда адаптация метода определения ДНК для ее оценки непосредственно в клиническом материале позволила бы не только установить степень или стадию воспалительного процесса, но и косвенно оценить функциональную активность лейкоцитов.

**Целью** настоящей работы стала разработка методики качественного и количественного определения ДНК как индикатора воспалительного процесса.

**Материал и методы.** В качестве флуоресцентного красителя для взаимодействия с ДНК нами был избран этидия бромид исходя из соотношения характеристик «специфичность/чувствительность/стоимость». Колориметрический краситель метиловый зеленый уступает бромистому этидию по чувствительности, а новые высокоактивные флуоресцентные ДНК-красители Sybr Green или PicoGreen существенно превосходят этидий по стоимости.

При выполнении исследования смешивали растворы ДНК в концентрациях от 20 до 0,1 мкг/мл с раствором этидия бромид в концентрации 5 мкг/мл (оба реактива – производства Sigma, США). В контроль включали раствор бромид этидия без ДНК. Измерения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре производства ЗАО «Солар».

В случае проведения реакции в 96-луночном полистироловом планшете растворы ДНК в разных концентрациях и бромида этидия смешивались в равных объемах по 0,1 мл непосредственно перед визуализацией. Полученную калибровочную кривую регистрировали с помощью трансиллюминатора UVT-1, оснащенного источниками УФО-излучения с максимумом 312 нм. Цифровое изображение результатов реакции получали с помощью камеры Canon G10 при съемке через оранжевый светофильтр.

**Результаты и обсуждение.** Нами была получена калибровочная кривая флюоресцентного определения комплекса «ДНК-этидия бромид», по которой определяли предел чувствительности метода. Он оказался равным 0,5-1,0 мкг ДНК/мл.

Визуальную калибровочную кривую, полученную при помощи трансиллюминатора использовали для оценки содержания ДНК в клиническом материале. Определяли содержание ДНК в материале из десневого кармана, полученного от пациентов с хроническим периодонтитом во время амбулаторного стоматологического приема. Оказалось, что концентрация ДНК в содержимом дентального кармана у пациента с заболеванием маргинального периодонта соответствует ~8,0 мкг/мл ДНК согласно визуальной калибровочной шкале.

Полученные данные подтвердились при использовании светодиодной стоматологической полимеризующей лампы в качестве возбуждающего

источника излучения с длиной волны 440-480 нм. При визуализации исследуемых проб ДНК в 96-луночном планшете четко прослеживается градация интенсивности свечения растворов ДНК различных концентраций. Эти данные в целом соответствовали полученной ранее калибровке с использованием спектрофлюориметра.

Исходя из вышеизложенного, создается возможность использования методики определения концентрации ДНК непосредственно на клиническом приеме врача-стоматолога (т.н. «on-chair» или «point-of-care» test). Для оценки степени активности, тяжести и прогнозирования развития хронического периодонтита на сегодняшний день не существует унифицированных лабораторных тестов, что при большом спектре клинических проявлений заболевания значительно затрудняет раннюю и точную верификацию данной патологии. Предложенная нами модификация метода определения ДНК будет способствовать решению этой задачи.

#### **Выводы.**

1. Проведена клиническая адаптация количественной и качественной методики определения ДНК в реакции с бромидом этидия с чувствительностью 0,5 мкг ДНК/мл.

2. Содержание ДНК в содержимом дентального кармана при маргинальном периодонтите составляет ~8,0 мкг/мл.

## **КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ IgA ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПЕРИОДОНТИТЕ**

*Коротина О.Л., Генералов И.И.*

*УО «Витебский государственный медицинский университет»*

**Актуальность.** В настоящее время доказано, что поликлональные каталитические антитела (АТ) или абзимы ("abzymes", от англ. – *antibody+enzyme*) регулярно появляются при самых разных аутоиммунных и инфекционных заболеваниях. При этом такие аутоабзимы имеют весьма различную субстратную специфичность – нуклеазную, протеолитическую, оксидоредуктазную.

Текущие исследования абзимной активности в подавляющем большинстве проводятся на каталитических АТ, относящихся к иммуноглобулинам класса G. В первую очередь это обусловлено сравнительной легкостью очистки IgG в сравнении с другими классами иммуноглобулинов. Тем не менее, каталитическая активность иммуноглобулинов других классов (и первую очередь – IgA) изучена совершенно недостаточно, несмотря на то, что общее содержание IgA в организме превышает содержание IgG.

Изучение абзимной активности IgA представляется весьма перспективным, поскольку молекула секреторного IgA может быть более эффективным катализатором по сравнению с IgG, учитывая ее многовалентность (ди- или тример), наличие большого количества сульфгидрильных групп и т.д. От-

сюда возникают возможности новой интерпретации явлений, связанных с местным гуморальным иммунитетом (IgA-опосредованным).

Тем не менее, имеются лишь единичные исследования, посвященные каталитической активности поликлональных IgA. Целенаправленного же исследования различных видов IgA-абзимов, появляющихся в норме или при каких-либо патологических состояниях, до сих пор не проводилось.

**Целью исследования** явилась характеристика каталитической (ДНКазной, протеолитической, оксидоредуктазной) активности иммуноглобулинов класса A, выделенных из ротовой жидкости здоровых лиц и пациентов с хроническим периодонтитом.

**Материал и методы.** Всего было выделено 27 проб IgA от пациентов с хроническим простым периодонтитом и 27 образцов IgA от группы здоровых лиц (контроль).

Для очистки IgA из ротовой жидкости применялась методика аффинной хроматографии на сефарозе, конъюгированной с антителами против общих IgA человека (Sigma, США).

Предварительную очистку образцов ротовой жидкости проводили следующим образом. До 8-10