

гие – резервуаром и амортизатором, обеспечивающим максимальное диастолическое наполнение предсердий. Существует и иное мнение, что эти структуры сердца являются активно функционирующими [1]. В последние десятилетия наблюдается бурное развитие кардиологии и кардиохирургии, что возобновило интерес к изучению морфологии и физиологии ушек сердца.

Целью нашего исследования являлось определение variability строения ушек сердца человека.

Материалом исследования служили 15 изолированных сердец взрослых людей, полученных для учебных целей в соответствии с Законом Республики Беларусь от 12.11.2001 года «О погребении и похоронном деле» (статья 6). Объектом исследования были 30 ушек сердец.

Для решения поставленных задач были использованы следующие методы: описательный, метод препарирования, морфометрический, статистический.

В результате исследования было выявлено, что внешние очертания правого ушка более простые и менее разнообразны по сравнению с аналогичным показателем для левого ушка. Левое ушко сердца было похоже по форме на червеобразный или S-образно изогнутый отросток, при этом на его краях наблюдалось большее количество и более глубокие насечки. Внешняя форма правого ушка чаще имела вид неправильного четырехугольника или треугольника, при этом количество насечек и углублений на обоих краях было немногочисленным. Сравнивая морфометрические характеристики правого и левого ушек, выявилось, что левое ушко длиннее правого по наружно-латеральной и внутренне-медиальной поверхностям. Эта особенность начала складываться в филогенезе и продолжилась в онтогенезе, что указывает на признаки рекапитуляции ушек и приспособление предсердий к изменяющимся условиям функционирования сердца. Левое ушко имеет большую протяженность соприкосновения с легочным стволом при наличии большей длины ушка, но меньшую толщину стенки, по сравнению с аналогичными показателями для правого ушка сердца. Левое ушко имеет шейку устья, тогда как правое ушко не имеет отграничения от предсердия и имеет больший диаметр устья. Внутренняя поверхность левого ушка сердца является трабекулярной структурой и имеет меньшее количество долей. В правом ушке наблюдаются более выраженные гребенчатые мышцы, которые участвуют в формировании долек.

Таким образом, выявлены индивидуальная variability строения ушек сердца и различия между правым и левым ушками.

Литература

1. Черкашина, А.Л. Формирование и изменчивость ушек сердца в филогенезе / А. Л. Черкашина, В. Г. Изатулин, В. Ю. Лебединский // Фундаментальные исследования. – 2005. – №9 – С.94.

©ВГМУ

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G

Ю.Г. САВКИНА, В.К. ОКУЛИЧ, С.А. СЕНЬКОВИЧ

The work is devoted to an estimation of proteolytic activity of class G immunoglobulins in patients with acute and chronic pyoinflammatory diseases. It is revealed, that in patients who suffer from chronic osteomyelitis, acute pyoinflammatory diseases the level of BAPNA-amidase (similar on trypsinum) activity of immunoglobulins is authentically higher, than in patients without purulent processes and in donors. The association of BAPNA-amidase activity of immunoglobulins with a kind of the agent of purulent process, the expression of inflammatory reaction, and the duration of stay of the patient in a hospital is revealed

Ключевые слова: абзимы, протеолитическая активность, иммуноглобулины.

1. ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на использование современных схем комплексной антимикробной терапии, проблема хирургической инфекции остается актуальной, поскольку при гнойно-воспалительных процессах нередко не удается достичь быстрого эффекта лечебных мероприятий. Создание новых методов лечения невозможно без знания механизмов взаимодействия микроорганизмов с иммунной системой макроорганизма. Тем не менее, некоторые из особенностей патогенеза инфекционного процесса остаются изученными недостаточно. Многие микроорганизмы – возбудители гнойно-воспалительных заболеваний – синтезируют протеолитические ферменты. Взаимодействие их с иммунной системой макроорганизма может приводить к образованию абзимов (иммуноглобулинов с ферментными свойствами) с протеолитической активностью. Такие абзимы могут влиять на патогенез гнойно-воспалительных заболеваний. Уровень протеолитической активности иммуноглобулинов пациентов с хирургической инфекцией при взаимодействии с различными субстратами может отличаться вследствие особенностей течения заболевания и возбудителя гнойно-воспалительного процесса. Полученные данные могут иметь значение для понимания патогенеза хирургической инфекции, а также для разработки новых диагностических критериев.

Объектом исследования явились иммуноглобулины класса G, выделенные из гнойного отделяемого у больных с хроническим остеомиелитом, острыми гнойно-воспалительными процессами, инфекцией челюстно-лицевой области.

Цель работы – оценка протеолитической активности иммуноглобулинов класса G у пациентов с хирургической инфекцией.

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Препараты иммуноглобулинов получали из сывороток крови пациентов с острыми гнойно-воспалительными процессами (35 пациента), с хроническим остеомиелитом (40 пациентов), с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области (33 пациента), а также у лиц с хирургической патологией без гнойных процессов (20 пациентов), что составили опытную группу, и у здоровых доноров (16 пациентов) – контрольная группа.

Все больные, составившие опытные и контрольную группы, прошли комплексное клиническое, инструментальное и лабораторное обследование. У больных с острыми гнойными заболеваниями диагноз был подтвержден интраоперационно.

В группу больных остеомиелитом набор производился из пациентов, находившихся на лечении в республиканском научно-практическом центре «Инфекция в хирургии». Группу острой хирургической инфекции составили пациенты, находившиеся на лечении в РНПЦИХ, в хирургических отделениях Витебской областной клинической больницы (ВОКБ) и Витебской центральной городской клинической больницы (ВГЦКБ) по поводу абсцессов мягких тканей, флегмон, гнойных перитонитов.

Кровь забиралась натощак с 8 до 9 часов утра из локтевой вены, центрифугировалась со скоростью 1500 оборотов в минуту в течение 10 минут; сыворотка отбиралась, замораживалась и хранилась при -25°C .

Выделение иммуноглобулинов начинали в день забора сыворотки крови без предварительной заморозки. Очистка проводилась в несколько этапов с использованием аффинной хроматографии на протеинеА золотистого стафилококка [1, 2, 3].

До проведения анализов образцы иммуноглобулинов замораживали в жидком азоте с последующим хранением в нем или при -25°C в холодильнике.

Контроль чистоты полученных препаратов иммуноглобулинов производили с помощью электрофореза в 10% и градиентном 4-20% полиакриламидном геле в присутствии додецил-сульфата натрия в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Гель окрашивали нитратом серебра [2].

Проверка стерильности полученного материала осуществлялась выборочным посевом проб иммуноглобулинов на кровяной агар и сахарный бульон.

При оценке уровня протеолитической активности иммуноглобулинов производили определение их бензоил-аргинин-*p*-нитроанилид (БАПНА)-амидазной активности, лизин-*p*-нитроанилид (ЛНА)-амидазной, ацетил-аспартат-*p*-нитроанилид (ААНА)-амидазной и эластазной активности. В основе метода лежит изменение оптической плотности раствора вследствие высвобождения *p*-нитроанилида при расщеплении субстрата по амидной связи (аналог пептидной).

При определении БАПНА-амидазной (ЛНА-, ААНА-амидазной) активности субстратная смесь состояла из 0,8% раствора субстрата на 0,02 М трис HCl-буфере с pH 7,4. Реакционная смесь состояла из 0,1 мл субстратной смеси и 0,1 мл иммуноглобулинов в концентрации 1,5 мг/мл (1 мг/мл при определении ЛНА-, ААНА-амидазной активности).

Реакции ставились в одноразовых плоскодонных полистироловых планшетах для ИФА. В качестве отрицательного контроля использовали 0,9% раствор NaCl. Учет результатов реакции производили после 20-ти часовой инкубации при 37°C на многоканальном спектрофотометре Ф300 при длине волны 405 нм.

При определении БАПНА-амидазной активности сывороток крови реакционная смесь состояла из 0,2 мл раствора БАПНА и 0,005 мл исследуемой сыворотки. В качестве отрицательного контроля использовали 0,005 мл физиологического раствора и 0,2 мл раствора БАПНА. Для устранения искажения результатов вследствие собственной окраски сыворотки оптическую плотность в лунках определяли как разницу оптической плотности после инкубации и до инкубации.

Эластазную активность иммуноглобулинов определяли по модифицированному нами методу с использованием эластин-Конго красного. Эластин-Конго красный (диаметр частиц 37-75 микрон, производство Sigma) использовали в концентрации 0,8 мг на 1 мл буфера как субстрат для иммуноглобулинов в 2 сериях буферных растворов (0,2 М солянокислый трис-буфер) с pH 7,4 и 8,8. При расщеплении эластина конго-красный переходит в раствор, изменяя его цвет с бесцветного на красный, с максимальным спектром поглощения 495 нм.

Для удобства постановки вместо пробирок нами предложено использовать эпендорфы. В один ряд эпендорфов вносили последовательно: 0,4 мл раствора эластин-Конго красного на трис-НСI буфере pH 7.4 и 0,1 мл иммуноглобулинов в концентрации 1 мг/мл. Во второй ряд – 0,4 мл раствора эластин-Конго красного на трис-НСI буфере pH 8.8 и 0,1 мл иммуноглобулинов в концентрации 1 мг/мл. Контролем служили пробы, содержащие раствор эластин-Конго красного в количестве 400 мкл и 100 мкл физиологического раствора. Далее проводили инкубацию проб в термостате при $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов. Затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали (10 тыс об/мин в течение 7 минут; MICRO 120) для осаждения оставшегося эластина-Конго красного в виде не разрушенных частиц. 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 (максимально близкой к 495) определяли оптическую плотность в лунках.

Определение количества иммуноглобулинов в сыворотке производили с помощью набора для иммуноферментного анализа «IgG общий – ИФА – БЕСТ» (ЗАО «Вектор-БЕСТ», Россия).

Для пересчета полученного результата в пикокаталы нами была получена формула:

$$Y=0,028+11\times E_{\text{оп}},$$

где Y – искомый результат; $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Предложенная формула была выведена на основе определения зависимости оптической плотности, измеренной на многоканальном спектрофотометре Ф300, от молярной концентрации р-нитроанилида в растворе (при распаде 1 молекулы субстрата образуется 1 молекула р-нитроанилида). Таким образом, нами был построен калибровочный график с коэффициентом корреляции 0,99 ($p<0,001$).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась, используя пакеты прикладных программ: Microsoft Excel 2000, BIOSTAT, Statgraphics Plus, Version 5.1.

Для определения достоверности отличия групп использовался критерий Стьюдента. Предварительно определялась нормальность распределения данных внутри групп: в случаях, когда асимметрия и эксцесс внутри групп по модулю не превышали 2, считали, что распределение приближается к нормальному. Если асимметрия или эксцесс внутри групп по модулю превышали 2, то для сравнения групп использовался критерий Манна-Уитни. Для сравнения достоверности отличия процентного содержания в группах проб, обладающих определенными признаками, использовали точный критерий Фишера. Корреляции вычислялись методом Пирсона. Для оценки силы влияния использовали однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ. Множественные регрессии и построение статистических моделей осуществлялось при помощи статистической программы Statgraphics Plus, Version 5.1.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При анализе результатов определения БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов G использовали также данные наших более ранних исследований. Оказалось, что уровень БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов в группах пациентов с гнойными процессами был достоверно выше, чем у пациентов без хирургической инфекции или здоровых доноров, причем достоверных отличий между группами в зависимости от остроты и локализации гнойного процесса выявлено не было ($p>0,05$).

При изучении связи БАПНА-амидазной активности с клиническими данными была выявлена отрицательная корреляция между уровнем активности иммуноглобулинов и временем пребывания пациента в стационаре ($r=-0,43$; $n=21$; $p<0,05$). Вероятным объяснением этой связи мы считаем снижение продукции абзимов у лиц с иммунодефицитными состояниями, которые и находятся в стационаре более длительно. Не исключено, что более быстрое выздоровление у пациентов с высокой каталитической активностью антител свидетельствует о их протективном действии. Также обнаружена положительная корреляция между наличием у больных высокого уровня БАПНА-амидазной активности Ig и повышением СОЭ ($r=0,53$; $n=21$; $p=0,01$).

При оценке группы пациентов с острыми гнойно-воспалительными процессами (включая больных с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области) методом однофакторного дисперсионного анализа выявлено, что на уровень БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов класса G оказывали влияние следующие факторы: абсолютный уровень лейкоцитов – 3 % ($n=38$, $p<0,05$), абсолютный уровень лимфоцитов – 2,9 % ($n=38$, $p<0,05$), абсолютного уровня моноцитов – 3,3 % ($n=38$, $p<0,01$), абсолютный уровень эозинофилов – 8,3 % ($n=38$, $p<0,01$).

Низкая степень влияния отдельных клинико-лабораторных проявлений на уровень БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов свидетельствует о том, что формирование БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов происходит при совокупном влиянии многих разнонаправ-

ленных факторов. Не удалось выявить связи между уровнем БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов и видом микроорганизма, вызвавшего инфекционный процесс, что также свидетельствует о полифакторной природе возникновения БАПНА-амидазной активности антител. Наличие БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов у пациентов без инфекционного процесса может быть связано с влиянием сапрофитной микрофлоры, а также с возникновением активности под влиянием факторов не инфекционной природы.

При определении ЛНА-амидазной выявлено, что уровень активности у пациентов с гнойно-воспалительными процессами был не высок и не отличался достоверно от уровня активности в группе здоровых доноров ($p > 0,05$).

Уровень ЛПА-амидазной активности в группе пациентов с гнойно-воспалительными процессами ($n=30$) составил: медиана – 0,320 пкат, 25–75 процентиля – соответственно 0,133 и 0,754 пкат и не отличался достоверно от уровня активности в группе здоровых доноров ($n=16$) – 0,281 пкат; 0,259–0,358 пкат.

При определении ААНА-амидазной активности выявлено, что уровень активности у пациентов с гнойно-воспалительными процессами не отличался достоверно от уровня активности в группе здоровых доноров ($p > 0,05$).

Ацетил-аспартат- p -нитроанилид – амидазная активность иммуноглобулинов G оказалась крайне низкой и составила у пациентов с гнойно-воспалительными процессами ($n=20$) – 0,083 пкат; 0 – 0,215 пкат. Уровень активности в группе здоровых доноров ($n=16$) достоверно не отличался от пациентов с гнойно-воспалительными процессами ($p > 0,05$) – 0,122 пкат; 0,083 – 0,149 пкат.

Важно отметить, что между уровнями БАПНА-амидазной, ЛПА-амидазной и ААНА-амидазной в полученных препаратах иммуноглобулинов отсутствовала значимая корреляция (коэффициент корреляции для каждой пары активностей составлял менее 0,2; $p > 0,05$). Из этого факта следует заключение о наличии нескольких отдельных фракций иммуноглобулинов в пробе с протеолитической активностью различной специфичности.

Нами был определен уровень эластазной активности 12 препаратов иммуноглобулинов G пациентов с гнойно-воспалительными процессами, однако уровень ее оказался крайне низок – и ни в одном препарате иммуноглобулинов ее уровень не отличался достоверно от контроля.

Для определения доли, приходящейся на иммуноглобулины в общей сывороточной протеолитической активности, нами было определено количество иммуноглобулинов в 19 сыворотках пациентов с хроническими и острыми гнойно-воспалительными процессами с помощью набора для иммуноферментного анализа. Для определения вклада БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов в общую сывороточную активность вычисляли общую активность иммуноглобулинов в сыворотке умножением удельной активности иммуноглобулинов на их концентрацию в сыворотке. Далее вычисляли долю активности, приходящейся на иммуноглобулины в общей сывороточной активности делением общей активности иммуноглобулинов на активность сыворотки.

Всего нами были исследованы пары иммуноглобулин-сыворотка, полученные от 12 пациентов с хроническим остеомиелитом и 7 пациентов с острой хирургической инфекцией. Установлено, что доля иммуноглобулинов в общей сывороточной протеолитической активности у пациентов с хирургической инфекцией оказалась весьма значительной и составила для лиц с хроническим остеомиелитом: медиана – 11,64%, 25–75 процентиля – 6,19% и 46,86%, а у пациентов с острыми гнойно-воспалительными процессами: медиана – 16,31%, 25–75 процентиля – 7,84% и 96,8%.

Следует отметить, что в 4 парах сыворотка-иммуноглобулин расчетная доля активности иммуноглобулина приближалась и даже превышала 100%. Очевидно, это связано с тем, что в сыворотке протеолитическая активность блокируется антипротеазами, но тем не менее, вклад иммуноглобулинов в общую сывороточную активность остается весьма значительным, что может играть роль в патогенезе гнойно-воспалительных заболеваний.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования протеолитической активности иммуноглобулинов G у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями можно сделать следующие выводы:

Нами получены и очищены препараты иммуноглобулинов класса G из сывороток крови 16 здоровых доноров, 33 пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области, 35 пациентов с острыми гнойно-воспалительными процессами, 40 пациентов с хроническим остеомиелитом и 15 хирургических больных без гнойно-воспалительных процессов.

1. Выявлено, что большинство проб IgG пациентов с гнойно-воспалительными процессами и здоровых доноров обладают протеолитической активностью за исключением эластазной.

2. Обнаружено, что в группе пациентов с хирургической инфекцией уровень БАПНА-амидазной активности был достоверно выше, ЛНА-амидазной не отличался, в тоже время уровень ААНА-амидазной активности оказался достоверно ниже, чем в группе здоровых доноров.

3. У пациентов с хирургической инфекцией установлено, что в общую БАПНА - амидазную активность сыворотки значительный вклад вносит абзимная активность (11,64% и 16,31% при хронических и острых гнойно-воспалительных процессах соответственно).

Указанные данные являются доказательством возможности синтеза каталитических антител в организме вследствие воздействия факторов агрессии и инвазии микроорганизмов (протеолитических ферментов) по механизму идиотип-антиидиотипического взаимодействия, что дополняет существующие представления о значении абзимов в развитии инфекционного процесса.

Разработанная нами при выполнении работы микромодификация метода определения эластазной активности сывороток и препаратов иммуноглобулинов имеет значительные преимущества перед исходным методом и другими способами определения активности: методическая простота, низкие трудозатраты, точный количественный учёт полученных результатов, специфичность реакции, возможность одновременного исследования большого количества образцов, малый расход реагентов. Кроме того, разработанная нами модификация значительно дешевле аналогичных за счет замены этапа фильтрации с использованием дорогостоящих фильтров на центрифугирование.

Метод может быть использован в клинических лабораториях лечебных учреждений любого звена, включая районное, для определения эластазной активности сывороток крови, иммуноглобулинов у пациентов с заболеваниями поджелудочной железы, с гнойно-септическими процессами и другой патологией, а также в научно-исследовательских лабораториях биологического профиля.

Литература

1. Невинский, Г.А. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии / Г.А. Невинский, Т.Г. Канышкова, В.Н. Бунева // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – № 11. – С. 1245–1255.
2. Иммунологические методы: пер. с нем. / Под ред. Г. Фримеля. - Москва, 1987. – 472 с.
3. Шишкин С.С. Использование связывания красителей для количественного определения содержания белка в растворах (обзор) / С.С. Шишкин // Вопросы медхимии. – 1982 - № 5. – С. 134-141.

©БГМУ

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ВРОЖДЕННОЙ ДИСФУНКЦИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ У ДЕТЕЙ

А.И. СЕМЕНОВИЧ, Ю.И. СЕМЕНОВИЧ, А.В. СОЛНЦЕВА

This article contains results of own research on questions of a course of a disease, features of clinical and laboratory manifestations depending on a sex and age of a patient. Efficiency of replacement therapy, influence of a compliance of patients on a forecast is analysed. Negative influence of inadequate treatment on physical and sexual developments of children is established

Ключевые слова: надпочечники, заместительная терапия, физическое развитие

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) – спектр заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, обусловленных дефектом ферментных систем, участвующих в синтезе стероидных гормонов надпочечников [1]. Поздняя диагностика, несвоевременная и неадекватная терапия приводят к тяжелым последствиям для здоровья ребенка.

Цель исследования: изучение клинико-анамнестических особенностей ВДКН у детей в зависимости от пола с оценкой эффективности проводимой терапии и соответствия ее международным стандартам в РБ, выявление причин и последствий неадекватного лечения.

Объект и методы исследования. Проведен анализ 32 историй болезни детей с ВДКН (18 мальчиков (М), 14 девочек (Д)), находившихся на диспансерном учете в амбулаторном отделении УЗ «2ГДКБ» (23 пациента) и проходивших стационарное лечение в данном УЗ в 2011-2012 годах (9 детей). Собран анамнез, проведено объективное обследование с оценкой физического развития по соматограммам, стадии полового развития по Таннеру, проанализированы результаты лабораторных исследований и лечение. Данные обработаны в Excel 2007.

Результаты и выводы. В 65,6% случаев имели место осложнения беременности, наиболее часто – угроза выкидыша (33,3%). В неонатальном периоде преобладали нарушения со стороны ЦНС (52,2%). Возраст постановки диагноза у М составил 34 ± 1 день жизни и значительно варьировал (от 10 до 75 дней), у Д – 15 ± 3 день ($p < 0,05$). Более поздняя диагностика ВДКН у М связана с отсутствием у них при рождении специфических симптомов заболевания. Отмечены выраженные нарушения клинικο-метаболического и гормонального статусов при манифестации сольтертяющей формы ВДКН, что свидетельствует об актуальности внедрения в Республике неонатального скрининга. Основные симптомы: потеря массы тела (98%), срыгивание и рвота (73,7%); у 78,2% детей – экзикоз и гипотрофия (3 степени только у М – 20%). У всех Д отмечены признаки внутриутробной вирилизации (в том числе у 2 Д - 5 степень по шкале Prader, у 6 Д – 3-4). Диагноз подтвержден высокими уровнями 17-