

УДК 577.1

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФРАКЦИЙ ОКСИПРОЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ¹

© 2012 Е.В. Писарева, М.Ю. Власов, Ю.В. Голуб² Е.Р. Стадлер³

Проведено сравнительное изучение содержания в сыворотке крови белково- и пептидосвязанных фракций оксипролина, подвергавшихся различным срокам гидролиза. От его продолжительности зависит полнота расщепления связанного оксипролина, а следовательно, и точность определения его содержания в сыворотке крови. Исследовали содержание фракций оксипролина в сыворотке крови детей с диагнозом ювенильный идиопатический артрит. В зависимости от показателей оксипролина также отмечалось состояние костной ткани у детей во время болезни.

Ключевые слова: оксипролин, резорбция, ювенильный идиопатический артрит, коллаген, гидролиз.

Введение

В настоящее время ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) представляет собой хроническое воспалительное заболевание суставов, начавшееся у ребенка до 16-летнего возраста [1].

Как известно, при аутоиммунных заболеваниях происходит усиленный распад коллагена. Его характерной особенностью является то, что 12–14 % его аминокислотных остатков приходится на оксипролин — аминокислоту, не найденную в других белках животных, за исключением эластина, который содержит 1–2 % оксипролина [2]. Исследование оксипролина (ОП) в биологических жидкостях дает информацию о состоянии обмена коллагена при заболеваниях, сопровождающихся деструктивными процессами в соединительной ткани [3]. Согласно данным литературы, метаболическая активность коллагена в костной ткани выше, чем в коже и других тканях, поэтому содержание оксипролина в крови отражает в основном метаболизм костного коллагена. Для оценки метаболизма костной ткани

¹Статья подготовлена в рамках Программы развития деятельности студенческих объединений "Интеграция студентов классического университета в науку, социально-проектную деятельность и гражданское общество — гарантия стабильного развития государства".

²Писарева Елена Владимировна (pellai@rambler.ru), Власов Михаил Юрьевич (mvlasov1@rambler.ru), Голуб Юлия Владимировна (yaliagolyb@mail.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1

³Стадлер Елена Рудольфовна (stadler@mail.ru), кафедра факультетской педиатрии Самарского государственного медицинского университета, 443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

изучали содержание в сыворотке крови различных фракций оксипролина. Затруднительным моментом в определении связанного оксипролина является неполнота проведенного гидролиза.

Цель исследования — установить время, которое необходимо для проведения полного гидролиза связанного оксипролина, и провести сравнительный анализ полученных показателей метаболизма костной ткани у детей, больных ЮИА.

Материал и методы исследования

В качестве исследуемого материала использовалась сыворотка крови детей с диагнозом ЮИА. В основную группу были включены дети ($n = 90$) с установленным диагнозом ЮИА, средний возраст составил $14,82 \pm 0,13$, которые в свою очередь были разделены на четыре группы в зависимости от рентгенологической стадии заболевания: в I группу вошли дети с первой стадией заболевания, характеризующейся околосуставным остеопорозом; II группу составили дети со второй стадией заболевания (остеопороз + сужение суставной щели (возможны единичные узурь)); III группа — дети с третьей стадией заболевания (остеопороз, сужение суставной щели, множественные узурь); IV группа — дети с четвертой стадией заболевания (остеопороз, сужение суставной щели, множественные узурь + костные анкилозы).

В группу контроля вошли дети ($n = 11$), больные реактивным артритом, в возрасте $14,58 \pm 0,24$. Их включили в группу контроля, так как реактивный артрит не приводит к изменениям в минеральном обмене костной ткани и обмене соединительной ткани.

В сыворотке крови определялись показатели метаболизма костной ткани: общий (ООП), свободный (СОП) и белковосвязанный (БСОП) оксипролин. Пептид-носвязанный оксипролин (ПОП) определялся как ООП с вычитанием суммы СОП и БСОП. Исследование этих показателей проводилось в биохимической лаборатории ИЭМБ СамГМУ.

Для определения количества ОП в сыворотке крови работа была разделена на 2 этапа. На подготовительном этапе белки различных фракций коллагена подвергали щелочному гидролизу в стеклянных запаянных ампулах. Гидролиз проводили сутки, 3, 5, 10 и 15 дней для установления времени полного гидролиза. Далее гидролизаты белков упаривали в фарфоровых чашках на водяной бане. Сухой остаток растворяли в точном объеме воды. Полученные растворы брали для определения количества оксипролина. СОП определяется без предварительного проведения гидролиза.

На втором этапе использовался метод, основанный на окислении ОП хлораминном В и конденсации продуктов его окисления с реактивом Эрлиха с образованием продукта, окрашенного в красный цвет, с дальнейшим определением оптической плотности на фотоэлектрическом концентрационном колориметре КФК-2 с длиной волны 590 нм. Это наиболее простая и достаточно точная методика определения ОП по Бергману и Локслей, представляющая собой модификацию метода Стегемана.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью t-критерия Стьюдента для зависимых выборок и определяли значимость различий (p). Критический уровень значимости в данном исследовании принимался $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе работы нами была разработана модификация метода, суть которой заключается в проведении щелочного гидролиза белков различных фракций коллагена при 110 °С с увеличением срока выдержки в термостате до 10 суток. Такой срок (10 дней) был выбран из расчёта степени гидролиза фракций ОП. Его максимальный показатель достигается уже на 10 сутки (рис. 1). Если проводить гидролиз меньше заданного времени, то не будет достоверности в определении связанного ОП в сыворотке крови. Гидролизирование больше 10 суток не имеет смысла, так как показатель степени гидролиза фракций оксипролина в дальнейшем держится на одном уровне, что указывает на то, что гидролиз прошел полностью. Таким образом, такое нововведение повышает точность к определению количества ОП в сыворотке крови.

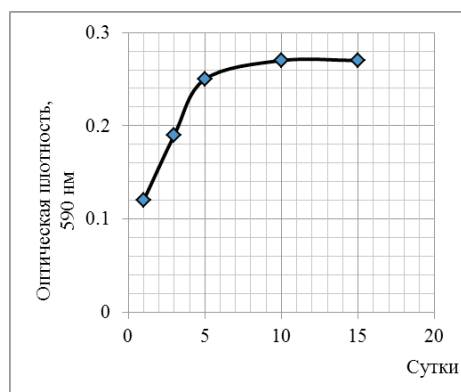


Рис. 1. Влияние времени гидролиза на уровень оксипролина в сыворотке крови

Исследование содержания оксипролина у детей с диагнозом ЮИА и детей с реактивным артритом позволило выявить ряд существенных отличий (см. таблицу).

Таблица

Содержание различных фракций оксипролина в сыворотке крови детей с диагнозом "ювенильный идиопатический артрит" в зависимости от рентгенологической стадии

Группы	ООП, мкг/мл	БСОП, мкг/мл	СОП, мкг/мл	ПОП, мкг/мл
I	345,76 ± 8,97*	222,48 ± 7,40*	18,58 ± 1,28	108,85 ± 7,80*
II	331,03 ± 8,12*	217,24 ± 6,03*	20,38 ± 1,94	97,46 ± 6,75
III	353,48 ± 11,90	227,94 ± 13,68*	19,67 ± 1,06	83,83 ± 10,99
IV	357,03 ± 17,33	218,12 ± 12,52*	17,94 ± 1,60	117,40 ± 12,24*
Контроль	383,77 ± 18,85	267,82 ± 16,59	21,01 ± 1,63	85,84 ± 10,74

Примечание. Звездочкой отмечены отличия от контроля, статистически достоверные с уровнем значимости $p < 0,05$.

Анализ результатов показал, что в I и IV группах при сравнении с группой контроля наблюдается низкое содержание БСОП и высокое ПОП, что свидетельствует о преобладании на данных стадиях процесса распада коллагена над процессами биосинтеза. ПОП характеризуется в большей степени продуктами неполного распада коллагена и невозможностью его вовлечения во вторичный синтез [4].

Отмечается пониженное содержание БСОП во всех опытных группах в отличие от группы детей с реактивным артритом, это указывает на то, что во время болезни у детей понижен процесс синтеза костной ткани.

У I и II групп детей отмечено достоверное снижение ООП сыворотки крови за счет снижения БСОП. Содержание СОП во всех группах находится в норме, что свидетельствует об отсутствии нарушений в терминальной стадии распада коллагена в тканях [5]. А от количества БСОП и ПОП будет зависеть, какой процесс в костной ткани будет превалировать, — распад или синтез.

Нами также выявлены различия в содержании фракций ОП на разных стадиях ЮИА в зависимости от пола. В группе сравнения таких различий не наблюдается.

Отмечено повышение у мальчиков СОП (рис. 2) и ПОП (рис. 3) в первой группе и СОП во второй по сравнению с данными показателями девочек, это свидетельствует, что на начальных этапах у мальчиков более высокая скорость деструкции коллагена. В четвертой группе мы видим, что у девочек по сравнению с мальчиками пониженный уровень содержания БСОП (рис. 4) и повышенный уровень ПОП, это указывает на то, что у девочек на последней стадии ЮИА преобладает процесс распад коллагена в отличие от мальчиков. Увеличение экскреции ОП у мальчиков, вероятно, связано с их активным ростом в этом возрасте.

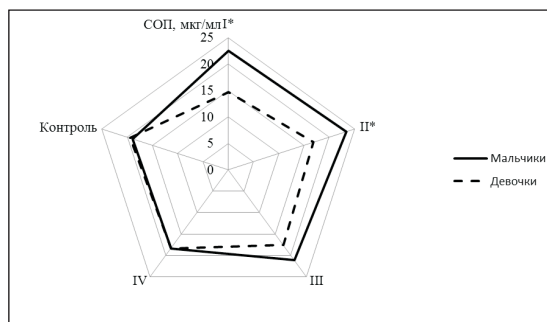


Рис. 2. Содержание свободного оксипролина в сыворотке крови мальчиков и девочек с диагнозом "ювенильный идиопатический артрит". Звездочкой отмечены отличия показателей в зависимости от пола на данной стадии ЮИА, статистически достоверные с уровнем значимости $p < 0,05$

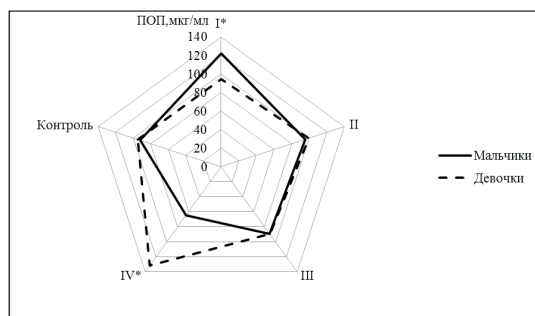


Рис. 3. Содержание пептидосвязанного оксипролина в сыворотке крови мальчиков и девочек с диагнозом "ювенильный идиопатический артрит". Звездочкой отмечены отличия показателей в зависимости от пола на данной стадии ЮИА, статистически достоверные с уровнем значимости $p < 0,05$

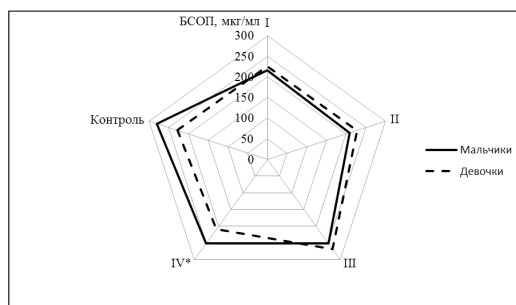


Рис. 4. Содержание белковосвязанного оксипролина в сыворотке крови мальчиков и девочек с диагнозом "ювенильный идиопатический артрит". Звездочкой отмечены отличия показателей в зависимости от пола на данной стадии ЮИА, статистически достоверные с уровнем значимости $p < 0,05$

Заключение

Таким образом, проведенный сравнительный анализ полученных показателей метаболизма костной ткани у детей, больных ЮИА, позволяет сделать следующие выводы.

1. Предложенное нами нововведение, суть которого заключается в увеличении срока гидролиза до 10 суток, позволяет повысить точность количественного определения ОП в связанном состоянии в сыворотке крови.

2. У детей на первой и четвертой стадиях ЮИА увеличивается содержание пептидосвязанного оксипролина в сыворотке крови, тогда как уровень белковосвязанного оксипролина понижается, что в целом свидетельствует об усилении процессов костной резорбции.

3. На первой стадии ювенильного идиопатического артрита у мальчиков резорбция костной ткани идет более активно, чем у девочек, тогда как на четвертой стадии ЮИА деструкция костной ткани повышается у девочек.

Литература

- [1] Кельцев В.А. Ювенильный идиопатический артрит. Самара: Содружество, 2005. 212 с.
- [2] Замараева Т.В. Метод определения содержания коллагеновых белков по оксипролину // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 262–264.
- [3] Мазуров В.И. Биохимия коллагеновых белков. М., 1974.
- [4] Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови // Лабораторное дело. 1990. № 5. С. 283–285.
- [5] Шараев П.Н. Диагностическое значение анализа показателей обмена коллагена // Клиническая лабораторная диагностика. 1997. № 6. С. 48.

MODIFICATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF OXYPROLINE IN BLOOD SERUM

© 2012 E.V. Pisareva, M.Y. Vlasov, Y.V. Golub⁴ E.R. Stadler⁵

A comparative study of serum fractions associated oxyproline underwent various periods of hydrolysis. Its duration depends on the completeness of splitting associated and consequently the accuracy of its content in the blood serum. The studies were conducted on children diagnosed with juvenile idiopathic arthritis. Depending on the performance OP also noted the state of bone tissue in children when they are sick.

Key words: oxyproline, resorption, juvenile idiopathic arthritis, collagen, hydrolysis.

Paper received 13/*XII*/2012.

Paper accepted 13/*XII*/2012.

⁴Pisareva Elena Vladimirovna (pella1@rambler.ru), Vlasov Mikhail Yurievich (mvlasov1@rambler.ru), Golub Yulia Vladimirovna (yaliagolyb@mail.ru), the Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.

⁵Stadler Elena Rudolfovna (stadler@mail.ru), the Dept. of Pediatric Faculty, Samara Medicine University, Samara, 443099, Russian Federation.