Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель магистерской
программы
_____ _____
подпись инициалы, фамилия
« 16 » июня 20 16 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование белков острой фазы воспаления при разных видах патологических состояний.

06.04.01.Биология

06.04.01.05. Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель _____ канд. биол. наук, доц. Ф.А. Гершкорон

Выпускник _____ М.В. Рожнова

Рецензент _____ д-р биол.наук О.А. Коленчукова

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Исследование белков острой фазы воспаления при разных видах патологических состояний» содержит 53 стр., 7 рисунков, 1 таблицу, 54 использованных источников.

Ключевые слова: белки острой фазывоспаления, С-реактивный белок, церулоплазмин, воспаление, гипоталамо-гипофизарная система, кортизол, тироксин.

Цель: исследовать содержание белков острой фазы воспаления в крови людей при разных видах патологических состояний.

Задачи:

1. исследовать содержание С-реактивного белка методом латекс-агглютинации в сыворотке крови людей при разных видах патологических состояний;
2. исследовать содержание церулоплазмина по методу Равина в плазме крови людей при разных видах патологических состояний;
3. исследовать содержание гормонов гипоталамо-гипофизарной системы кортизола и тироксина методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови людей при разных видах патологических состояний;
4. проанализировать зависимость концентрации гормонов гипоталамо-гипофизарной системы и белков острой фазы при разных видах патологических состояний.

В результате исследований выявлено повышение концентраций белков острой фазы по сравнению с контрольной группой. Выявлена корреляционная зависимость между уровнем С-реактивного белка и гормона гипоталамо-гипофизарной системы – тироксина.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……..……5

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……..7

1. БЕЛКИ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ…….……7

1.1. Острая фаза воспаления……..……..…..7

1.2. Белки острой фазы……..…...11

1.2.1. С-реактивный белок…….……16

1.2.2. Церулоплазмин……..……..….……17

2. ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНАЯ СИСТЕМА…….....….…….21

2.1. Гормоны гипоталамо-гипофизарной системы……22

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ……..……...…...……...…….…..25

3.1. Материалы исследования……..25

3.2. Метод определеняе церулоплазмина по методу Равина...…….....25

3.3. Метод определения С-реактивного белка латекс-агглютинации…..26

3.4. Определение концентрации кортизола методом иммуноферментного анализа…….…30

3.5. Определение концентрации тироксина методом иммуноферментного анализа…….…...33

4. РЕЗУЛЬТАТЫ……..…..……....36

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ……..37

БЛАГОДАРНОСТИ…….38

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ...…….39

ВВЕДЕНИЕ

В медицине широко используются многочисленные общие клинические, гематологические, биохимические, биофизические, и другие методы исследования крови, печени, почек, желудка и т.д. без этих методов немыслимы оценка состояния обмена веществ, функций отдельных органов и систем, постановка диагноза, контроль за эффективностью лечения [20].

Лабораторное обследование в клинико-диагностических лабораториях является одним из компонентов современного диагностического процесса. Лабораторные исследования, проводимые в динамике, позволяют не только выявить те или иные нарушения в деятельности отдельных органов и систем, но и проследить за течением болезненного процесса, а также наблюдать за эффективностью лечения и своевременно распознавать различные осложнения и отягощения патологического процесса [13].

Клиническая лабораторная диагностика - отрасль медицинской науки и практики, предметом которой является изучение закономерностей взаимосвязей между физиологическим и патологическим состоянием организма с одной стороны, и изменением состава компонентов его клеток и биологических жидкостей - с другой [13].

Комплекс местных и системных изменений, возникающих непосредственно вслед за повреждением, направленный на восстановление функций в совокупности составляет понятие острой фазы воспаления [5].

Важнейший аспект острой фазы - повышенная продукция печенью белков острой фазы воспаления (α_1-антитрипсин, орозомукоид, церулоплазмин, С-реактивный белок, гаптоглобин и др.). Увеличение концентрации белков острой фазы в крови является хорошим индикатором не только явного, но и скрытого воспаления (например, атеросклероз) [7].

Уровень С-реактивного белка (СРБ) в крови, измеряемый высокочувствительными методами, является прогностически значимым среди новых маркеров, в тоже время о значении других белков острой фазы воспаления изучено мало[49].

Цель работы: исследовать содержание белков острой фазы воспаления в крови людей при разных видах патологических состояний.

Задачи работы:

- исследовать содержание С-реактивного белка методом латекс-агглютинации в сыворотке крови людей при разных видах патологических состояний;
- исследовать содержание церулоплазмина по методу Равина в плазме крови людей при разных видах патологических состояний;
- исследовать содержание гормонов гипоталамо-гипофизарной системы кортизола и тироксина методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови людей при разных видах патологических состояний;
- проанализировать зависимость концентрации гормонов гипоталамо-гипофизарной системы и белков острой фазы при разных видах патологических состояний.

Работа проведена на базе СФУ.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. БЕЛКИ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ

Белки являются наиболее важными и сложными органическими соединениями, входящими в состав живых организмов. Не только каждый вид живого, но и каждый орган, каждый тип клеток обладает своим специфическим набором белков.

1.1. Острая фаза воспаления

Одной из важнейших реакций организма, обеспечивающих жизнедеятельность организма, является воспаление. **Воспаление -** это целесообразная и благоприятная реакция организма на повреждение и инфицирование, т.е., это реакция организма на воздействия, нарушающие гомеостаз. Воспалительная реакция направлена на восстановление исходного состояния организма [13].

Главным органом, который реагирует на повреждение тканей и воспаление, является печень. Клетки печени синтезируют и направляют в кровоток белки, которые оказывают значительное влияние на течение воспалительного процесса.

При повреждении тканей и воспалении различной этиологии в плазме крови изменяется концентрация до 30 белков, так или иначе участвующих в воспалительных реакциях ответа организма на повреждение. Появление их в крови или увеличение их содержания указывает на наличие воспалительного процесса. Поэтому их и называют «белками острой фазы воспаления» [26].

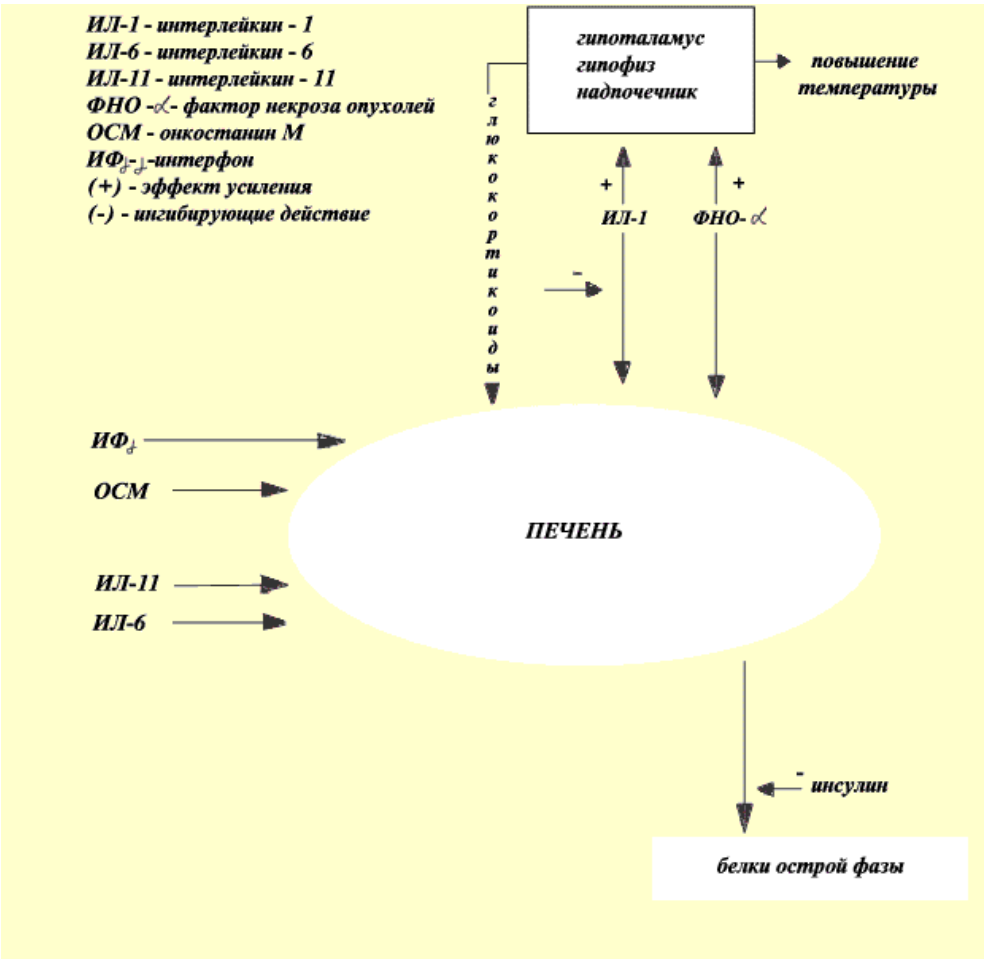

Рисунок 1 - Схема регуляции синтеза белков острой фазы в печени [44]

При определении общего количества белка различают нормальное его количество, понижение (гипопротеинемию) и повышенное (гиперпротеинемию).

Гипропротеинемия возникает вследствие:

- недостаточного введения белка;
- повышенной потери белка;
- нарушения образования белка в организме;
- сочетания различных из перечисленных причин.

Недостаточное поступление белка может быть при длительном голодании. Повышенная потеря белка происходит при различных заболеваниях почек, кровопотерях, новообразованиях. Нарушение образования белка возможно при недостаточности функции печени (гепатиты, циррозы, подострая дистрофия пече-

ни). Небольшая степень гипопротеинемии возможна при беременности вследствие того, что объем циркулирующей крови увеличивается значительнее, чем общее количество белка плазмы.

При изменении интенсивности синтеза или повышении распада белка в крови падает его общее количество. Если же концентрация белка изменятся только вследствие изменения объема внутрисосудистой жидкости, то общее количество белка остается неизменным, снижается только его концентрация. В таких случаях говорят об относительной гипер- или гипопротеинемии.

Гиперпротеинемия нередко развивается как следствие дегидратации в результате потери части внутрисосудистой жидкости. Это происходит при тяжелых травмах, обширных ожогах, холере. При острых инфекциях содержание белка часто повышается от дегидратации и одновременного выброса белков острой фазы. При хронических инфекциях содержание белка в крови может нарастать в результате иммунного процесса с увеличением концентрации иммуноглобулинов [19].

В воспалительном процессе выделяются три стадии:

стадия альтерации,

стадия вторичной альтерации (экссудации и инфильтрации),

стадия пролиферации [26].

Разнообразные факторы внешней среды могут провоцировать повреждения определенных типов клеток или субклеточных структур, обуславливая формирование первой фазы воспаления - стадию альтерации (повреждение клеток) с выходом лизосомальных ферментов. Под влиянием большинства повреждающих факторов альтерация приводит к увеличению объема поврежденной ткани благодаря выходу в нее плазмы крови. В результате этого снижается концентрация вредных агентов и продуктов их метаболизма, а также продуктов, возникающих в результате повреждения [3].

Затем в поврежденную ткань проникают специализированные клетки, которые устраняют причину повреждения и погибшие и поврежденные клетки

тканей. Одновременно кровью в участок повреждения доставляются в повышенном количестве энергосубстраты, необходимые для метаболизма клеток и других процессов, в частности, для инактивации высвобождающихся гидролаз, образования защитного барьера (фибрина) и других, что характеризует стадию экссудации и инфильтрации (воспалительного инфильтрата).

За этой фазой следует заключительная стадия воспаления, на которой идет восстановление поврежденной ткани, - стадия репарации образовавшихся дефектов (стадия пролиферации). В результате погибшие клетки либо замещаются себе подобными, либо замещаются менее ценной тканью рубцом[32].

Таким образом, сначала устраняется причина воспаления, а затем - поврежденные клетки. Для восстановления нормального метаболизма необходимо, чтобы очаг воспаления был очищен, и все живое было отделено от мертвых тканей и клеток [26].

Биологический смысл воспаления как эволюционно сложившегося процесса заключается в отграничении и ликвидации очага повреждения и вызвавших его патогенных факторов [25]. Воспалительной реакцией организм отвечает как на экзогенные, так и на эндогенные патологические раздражители.

Острое воспаление является физиологической реакцией организма, направленной на элиминацию вторгшихся микробных агентов, очищение ткани от разрушенных собственных клеток и макромолекул и восстановление структурно-функциональной полноценности органа. Характер и сила воспалительной реакции определяется природой патогена, величиной и характером тканевого повреждения, степенью и формой участия иммунной системы в этом процессе. Острая местная воспалительная реакция обычно быстро развивается и длится непродолжительно. Как правило, она не приводит к каким-либо необратимым процессам в тканях. Часто к локальному воспалению присоединяется системная реакция воспаления [6].

Известно, что наряду с местными реакциями при воспалении происходит ряд системных изменений. Комплекс местных и системных изменений, возни-

кающих непосредственно вслед за повреждением, в совокупности составляет **острую фазу воспаления**, которая характеризуется повышением температуры, изменением проницаемости сосудов, изменением биосинтетических и метаболических процессов многих органов. В развитии острой фазы воспаления участвуют системы всего организма: иммунная, эндокринная, сердечно-сосудистая, центральная нервная.

Для острой фазы воспаления характерны:

неспецифичность и универсальность;

направленность на ограничение очага повреждения и репарацию;

изменение биосинтеза белков в печени.

Длительность острой фазы воспаления 7-12 дней [26].

Смысл острофазового ответа заключается в том, чтобы помочь организму восстановить нарушенный гомеостаз путем контроля за кровопотерей, отграничения зоны повреждения и резорбции некротических тканей, связывания и удаления избыточного количества тканевых протеаз и экзогенных субстанций, создания условий для репарации [33].

1.2. Белки острой фазы

Белки острой фазы (БОФ) - большая группа белков сыворотки крови (в основном α-глобулинов) с молекулярной массой от 12 кДа до 340 кДа и различными функциями, объединенных по общему признаку - быстрое и значительное увеличение концентрации при бактериальной, вирусной, паразитарной инфекции, физической или химической травме, токсической или аутоиммунной реакции, злокачественных новообразованиях. Смысл данного увеличения заключается в повышении резистентности клеток к окислению, в ограничении повреждения тканей, в подавлении скорости размножения бактерий. Увеличение кон-

центрации БОФ в крови является хорошим индикатором не только явного, но и скрытого воспаления (например, атеросклероз)[1].

Основные стимуляторы образования БОФ - воспалительные цитокины, образующиеся при воспалении: интерлейкин-6, интерлейкин-1, интерферон-7, транформирующий фактор роста и, возможно, интерлейкин-8. Эти цитокины, распространяясь с кровью, стимулируют гепатоциты печени и другие клетки к синтезу и секреции БОФ. Этот ответ обеспечивает раннюю защиту и даёт возможность организму распознавать чужеродные субстанции при инфекционном процессе, предваряя реализацию полноценного иммунного ответа [28].

Синтезом белков острой фазы сопровождаются:

бактериальные инфекции;

различные воспаления;

травмы, ожоги;

злокачественные новообразования;

ревматоидный артрит;

инфаркт миокарда;

беременность и ряд других состояний [19].

К БОФ относят С-реактивный белок, сывороточный амилоид А, гаптоглобин, α2-макроглобулин, церулоплазмин, α1-глико-протеин, α1-антитрипсин, орозомукоид, компоненты комплемента С1-С4, С9. Трансферрин относят к негативным белкам острой фазы - его концентрация при воспалениях снижается.

При воспалении активируется выработка гепатоцитами БОФ, концентрация которых зависит от стадии заболевания и от масштабов повреждений. Также отдельные БОФ продуцируются моноцитами, нейтрофилами, плацентой и сосудистыми сплетениями. Синтез белков включается и регулируется рядом медиаторов, среди которых цитокины, анафилотоксины, глюкокортикоиды. Некоторые из этих медиаторов образуют непосредственно в очаге воспаления активированные макрофаги, лимфоциты и другие клетки.

Особенность большинства БОФ - их неспецифичность (по отношению к первопричине воспаления) и высокая корреляция их концентраций в крови с тяжестью заболевания и с его стадией. Это делает белки более удобными маркерами воспаления в отличие, например от, таких, как скорость оседания эритроцитов, подсчет количества лейкоцитов и сдвиг лейкоцитарной формулы. Именно поэтому ценность их определения для мониторинга течения заболеваний и контроля эффективности лечения трудно переоценить. В то же время дифференциальная диагностическая значимость этих тестов, в силу их неспецифичности, весьма ограничена.

Изменение концентрации различных белков в условиях повреждения и воспаления варьирует в широких пределах. БОФ классифицируют в зависимости от степени увеличения их концентрации при физической травме, заболевании:

Белки, уровень которых возрастает при повреждении очень быстро (в первые 6-8 часов) и значительно (в 20-100 раз, в отдельных случаях - в 1000 раз). К ним относят С-реактивный белок и амилоидный А белок сыворотки крови. При эффективном лечении бактериальной инфекции снижение уровня С-реактивного белка начинается с 3-х суток, а на 6-10-й день он возвращается к норме.

Вторую группу составляют белки, концентрация которых может увеличиваться существенно (в 2-5 раз). Тесты на кислый α_1-гликопротеид (орозомукоид), α_1-антитрипсин (α_1-ингибитор протеиназ), фибриноген, гаптоглобин имеют очевидную информативность при многих заболеваниях. Нормализация их концентраций происходит более медленно, чем уровня С-реактивного белка.

Белки третьей группы - церулоплазмин, С3-компонент комплемента. Индивидуальной оценки требует интерпретация результатов измерения их концентраций, уровень которых увеличивается на 20-60% от исходного, и в ряде случаев может не превышать пределов диапазона вариаций нормальных концентраций этих белков в плазме крови здорового человека.

К так называемым нейтральным реактантам острой фазы относят белки, концентрация которых может оставаться в пределах нормальных значений, однако они принимают участие в реакциях острой фазы воспаления. Это α_1-макроглобулин, гемопексин, амилоидный Р-белок сыворотки крови, иммуноглобулины.

Содержание «негативных» реактантов острой фазы может снижаться на 30-60%. Наиболее диагностически значимые из этой группы белков - альбумин, трансферрин, α-липопротеид, преальбумин. Уменьшение концентрации отдельных белков в острой фазе воспаления может быть обусловлено снижением синтеза, увеличением потребления, либо изменением их распределения в организме[9].

Среди белков острой фазы выделяют следующие группы: белки-медиаторы, белки-ингибиторы, транспортные, иммунорегуляторы, репараторы и резорбаторы [2]. Один белок по своим функциональным свойствам может относиться сразу к нескольким группам.

α_1-Антитрипсин (α_1-протеиназный ингибитор) - гликопротеин, образуемый в печени. Белок является ингибитором сериновых протеиназ (трипсина, химотрипсина, калликреина, плазмина, эластазы лейкоцитов) и обуславливает 92-94% от общей антипротеолитической функции крови [14].

α_1-Антихимотрипсин (ранее α_1-гликопротеин Шульца) является одним из реагирующих первыми БОФ (уровень в сыворотке может удваиваться в течение нескольких часов), представляет собой слабый специфический ингибитор химотрипсина, вместе с тем отмечена его активность по отношению и к другим протеазам.

α_2-Макроглобулин - цинксодержащий БОФ, который содержит 4 идентичных субъединицы и включает углеводный компонент. Белок синтезируется в печени и в иммунокомпетентных клетках. Белок контролирует развитие инфекций и воспалительных процессов, является ингибитором протеиназ (как сверты-

вающей системы крови, так и других) - плазмина, пепсина, трипсина, химотрипсина, эндопептидаз, катепсина D, тромбина, калликреина.

Гаптоглобин синтезируется в печени и в низких концентрациях присутствует во многих жидкостях организма - ликворе, лимфе, синовиальной жидкости, желчи. Гаптоглобин способен связывать гемоглобин с образованием комплекса, предохраняющего организм от потери железа и обладающего пероксидазной активностью. Гаптоглобин выполняет неспецифическую защитную функцию, комплексируясь с белковыми и небелковыми веществами, появляющимися при распаде клеток, может участвовать в утилизации некоторых патогенных бактерий, участвует в транспорте витамина B_{12}, достаточно эффективно ингибирует катепсины C, B и L.

Сывороточные амилоидные белки (SAA) - аполипопротеины липопротеинов высокой плотности. У человека существуют четыре формы амилоидов (SAA1 - SAA4). Синтез сывороточных амилоидных белков запускается действием интерлейкина 1 и интерлейкина 6. Эти белки участвуют в острофазовом ответе, способны взаимодействовать с липопротеинами высокой плотности, что приводит к утрате данными липопротеинами антиатерогенных свойств (способность понижать количество холестерина в крови).

Орозомукоид (кислый α_1-гликопротеид) - белок плазмы крови, наиболее богатый углеводами. Обладает антигепариновой активностью, может изменять адгезию тромбоцитов, способен ингибировать активность протеолитических ферментов, подавлять иммунореактивность, связывать многие лекарственные средства и некоторые гормоны (прогестерон). Синтез орозомукоида стимулируют липополисахариды, высвобождаемые из макрофагов, активированных интерлейкином-6.

Трансферрин - белки плазмы крови, которые осуществляют транспорт ионов железа. Трансферрины представляют собой гликозилированые белки, которые прочно, но обратимо связывают ионы железа. С трансферринами связано около 0,1% всех ионов железа в организме (что составляет порядка 4 мг).

Трансферрины имеют молекулярную массу около 80 кДа и имеют два места связывания Fe^{3+} [2].

1.2.1. С-реактивный белок

С-реактивный белок (СРБ) был впервые обнаружен в 1930 г. в сыворотке крови больных с пневмококковой пневмонией [51]. Позднее было отмечено, что в присутствии ионов кальция данный белок способен образовывать комплексы с С-полисахаридным компонентом мембраны пневмококка. Исходя из сути данной реакции, белок получил название «C-reactive protein»[34].

С-реактивный белок (СРБ) известен как индикатор воспаления и эффективной защиты при бактериальных инфекциях [11].

Физиологический уровень СРБ зависит от многих факторов: наследственности, особенностей питания, заболеваний, перенесенных в детстве, и др.

Содержание СРБ в сыворотке в норме - менее 5 мг/л [30].

СРБ определяется в сыворотке при различных воспалительных и некротических процессах и является показателем острой фазы их течения. Свое название он получил из-за способности преципитировать С-полисахарид клеточной стенки пневмококка. СРБ усиливает подвижность лейкоцитов. Связываясь с Т-лимфоцитами, он влияет на их функциональную активность, инициируя реакции преципитации, агглютинации, фагоцитоза и связывания комплемента. Повышение СРБ в крови начинается через 14-24 ч с момента начала воспаления и исчезает в ходе реконвалесценции. СРБ синтезируется в печени и состоит из 5 кольцевых субъединиц. В присутствии кальция СРБ связывает лиганды в полисахаридах микроорганизмов и вызывает их элиминацию. Важное диагностическое значение имеет количественное определение СРБ. Повышение концентрации СРБ является самым ранним признаком инфекции, а эффективная терапия проявляется снижением концентрации. Его уровень отражает интенсивность воспалительного процесса, и контроль за

ним важен для мониторинга этих заболеваний. СРБ при воспалительном процессе может повышаться в 20 раз и более [21, 22].

Биологические функции С-реактивного белка

В настоящее время можно считать, что главной функцией СРБ у млекопитающих является иммунорегуляторная, изменяющая иммунные и неспецифические реакции и обеспечивающая кооперацию между ними [23, 24]. Тест количественного определения СРБ в крови получил широкое распространение в клинической лабораторной практике для диагностики и мониторинга при различных заболеваниях (в ревматологии, пульмонологии, гематологии, хирургии, кардиологии, урологии и др.), оценки активности воспалительного процесса, выбора адекватного лечения, контроля и прогноза болезни [36, 39].

1.2.2. Церулоплазмин

Церулоплазмин (ЦП) - медьсодержащая ферро-O_2-оксидаза, гликопротеид, относящийся к α_2-глобулиновой фракции плазмы крови млекопитающих, содержащий 90% всей меди плазмы. Средняя молекулярная масса - 150кДа. Ген ЦП расположен на хромосоме 3 - 3q23-q24. Молекула ЦП представляет собой β-глобулин, составную часть альфа-2-глобулиновой фракции плазмы крови человека. Этот белок насчитывает 1046 аминокислотных остатков, содержит 6 доменов и вместе с 6 ионами меди образует тригональную структуру [38, 52]. Согласно современным данным, у этой медьсодержащей оксидазы ионы меди представлены тремя типами. Ион меди первого типа имеет пик оптического поглощения при 6*10 нм и определяет интенсивный голубой цвет ферментов данного класса, поэтому их часто называют «голубыми» белками [47]. С ионами меди первого типа взаимодействуют два азота гитидина, SH-группа цистеина и остаток метионина - вместе они формируют координационную сферу ионов меди. Ион меди второго типа имеет типичный ЭПР-спектр двухвалентной меди и не вносит вклада в оптические спектры медьсодержащих оксидаз [40, 41]. Два

иона меди третьего типа образуют биядерный медный комплекс с максимумом поглощения 330 нм. Ион меди второго типа и два иона третьего типа образуют «трехъядерный кластер» - лигандами этого трехъядерного комплекса являются 8 остатков гистидина, расположенных в 4-х консервативных аминокислотных последовательностях [45]. В шестидоменной структуре оксидазы домены 2, 4 и 6 содержат по одному иону меди 1-го типа. За характерный «голубой» цвет молекулы ЦП ответственны ионы 1-го типа, локализованные в доменах 4 и 6 и связанные с остатками метионина. В домене 2 с ионом меди связан лейцин ван-дер-ваальсовыми силами.

Трехъядерный кластер в молекуле ЦП формируется доменами 1 и 6, причем ионы меди связаны с четырьмя остатками гистидина в первом домене и с четырьмя в шестом. Трехъядерный кластер и ион меди 1-го домена формируют оксидазный центр церулоплазмина. Структурное сходство этого центра с активными центрами других медьсодержащих оксидаз объясняет оксидазное действие ЦП, обеспечивающее его ферроксидазную и антиоксидазную активность[38]. Известны две изоформы церулоплазмина человека, каждая из них - это сывороточный гликопротеин, представленный одной полипептидной цепью[48].

Медь - это необходимый элемент для многих биологических процессов. Функциональный диапазон ее весьма широк - от влияния на экспрессию специфических генов до участия в построении кофакторных и специфических групп медьзависимых ферментов. Медь как микроэлемент необходима для роста организма, нормального функционирования иммунной системы, созревания клеток крови, метаболизма глюкозы и холестерина, развития и функционирования мозговой ткани, сокращения миокарда [51].

Биологические функции церулоплазмина

В плазме крови в норме ЦП содержится в концентрации 0,20-0,40 мг/мл. Увеличение синтеза ЦП наблюдается под действием интерлейкина-6. Повышение концентрации ЦП коррелирует с увеличением уровня других острофазовых

маркеров. Также повышенные концентрации выявляются при хронических воспалительных процессах, холестазе, ревматоидном артрите, системной красной волчанке, гепатите, циррозе печени, инфаркте миокарда, шизофрении, острых инфекциях, злокачественных новообразованиях с метастазами, при беременности и использовании эстрогенов.

Понижение уровня ЦП может быть обусловлено: болезнью Вильсона-Коновалова (снижение синтеза фермента), синдромом Менкеса, ацерулоплазминемией, тяжелыми заболеваниями печени, снижением абсорбции меди (нарушения всасывания, недостаточность питания), потерями с общим белком плазмы при заболеваниях ЖКТ или нефротическом синдроме [42].

Основным источником синтеза ЦП в организме является печень. Однако и некоторые другие ткани также способны его вырабатывать. Обнаружена экспрессия гена ЦП в лимфоцитах [46], в мононуклеарных клетках селезенки [53], в тканях мозга [43], в бронхах [54], в клетках эндометрия матки [50]. ЦП был выявлен в клетках легких на всем протяжении воздухоносных путей и в альвеолах[43], причем, при воспалительном процессе его уровень в клетках бронхиального эпителия, особенно крупных бронхов, резко возрастал. Основное количество ЦП содержится в плазме крови и составляет 300-580мг/л [16]. Среди многообразных функций ЦП в настоящее время могут быть выделены следующие основные [4, 27]:

1) транспорт и регулирование оборота меди в крови и органах;

2) ферроокси дазное действие и иммобилизация сывороточного железа;

3) антиоксидантное действие;

4) участие в острофазных реакциях;

5) повышает стабильность всех клеточных мембрат;

Большого внимания заслуживают свойства ЦП, на основании которых он был классифицирован как белок острой фазы воспаления. Установлено, что уровень ЦП в сыворотке крови значительно изменяется при различных инфекционных заболеваниях; остром и хроническом воспалительных процессах, со-

провождающихся деструктивными и некротическими изменениями в тканях; при злокачественном опухолевом росте, при наследственных ацерулоплазминемиях, при ишемической болезни сердца [4].

Белок острой фазы церулоплазмин обладает способностью снижать проагрегантные свойства тромбоцитов, что может расцениваться как наличие обратной связи в реализации процесса воспаления [10].

Церулоплазмин обладает выраженной оксидазной активностью; в плазме он также ограничивает освобождение запасов железа, активирует окисление аскорбиновой кислоты, норадреналина, серотонина и сульфгидрильных соединений, а также инактивирует активные формы кислорода, предотвращая перекисное окисление липидов.

Недостаточность церулоплазмина вследствие нарушения его синтеза в печени вызывает болезнь Вильсона-Коновалова (гепатоцеребральная дегенерация). При недостаточности церулоплазмина ионы меди выходят во внесосудистое пространство (содержание меди в крови также снижается). Они проходят через базальные мембраны почек в гломерулярный фильтрат и выводятся с мочой или накапливаются в соединительной ткани (например, в роговице). Для проявления признаков заболевания особое значение имеет степень накопления меди в ЦНС. Недостаточность ионов меди в крови (вследствие дефицита церулоплазмина) приводит к повышению их резорбции в кишечнике, что еще больше способствует ее накоплению в организме с последующим воздействием на ряд жизненно важных процессов. Низкие уровни церулоплазмина в сыворотке крови отмечаются также при нефротическом синдроме, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, тяжелых заболеваниях печени вследствие его потерь и нарушения синтеза [15, 29].

2. ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНАЯ СИСТЕМА

Гипоталамо-гипофизарная система - морфофункциональное объединение структур гипоталамуса и гипофиза, выполняющее функции, как нервной системы, так и эндокринной, принимает участие в регуляции основных вегетативных функций организма.

В гипоталамо-гипофизарной системе различают ножку гипофиза, начинающуюся в вентромедиальной области гипоталамуса и три доли гипофиза: переднюю (аденогипофиз), заднюю (нейрогипофиз) и вставочную. Работа всех трёх долей управляется нейросекреторными клетками гипоталамуса. Эти клетки секретируют гипоталамические гормоны (вазопрессин, окситоцин), выделяющиеся через нейрогипофиз, и гипофизотропные гормоны (рилизинг-факторы), которые высвобождаются в портальную систему гипофиза, достигают клеток аденогипофиза, угнетая или усиливая их секреторную активность, изменяя скорость секреции тропных гормонов гипофиза [17].

Связь между гипоталамусом и гипофизом. Согласно классическому определению эндокринной системы следует считать, что некоторые участки центральной нервной системы функционируют как эндокринные железы: они вырабатывают гормоны и выделяют их в кровь для доставки к органу-мишени. Одной из таких структур является гипофиз [31].

Существует два типа рилизинг-факторов - стимулирующие (либерины) и останавливающие (статины) секрецию гормонов аденогипофизом. Либерины (кортиколиберины, гонадолиберины, тиреолиберины) стимулируют выработку тропных гормонов гипофиза (тиреотропин, кортикотропин, гонадотропин), которые в свою очередь стимулируют соответствующие железы (надпочечники, щитовидную, половые железы).

После воздействия какого-либо стимула на организм нервные стресс-импульсы, достигая нейроэндокринных клеток гипоталамуса, способствуют секреции гуморальных медиаторов. Среди них кортикотропинрилизинг-фактор вызывает высвобождение адренокортикотропного гормона из аденогипофиза в общее кровеносное русло. Достигая коры надпочечников, адренокортикотроп-

ный гормон стимулирует секрецию глюкокортикоидов (в частности, гормона кортизола), обеспечивая глюконеогенез, позволяющий энергетически насытить адаптивные реакции. Также он незначительно повышает синтез надпочечниками прогестерона, андрогенов и эстрогенов [18].

2.1. Гормоны гипоталамо-гипофизарной системы

Гормоны - это органические вещества, которые образуются в тканях одного типа (эндокринные железы, или железы внутренней секреции), поступают в кровь, переносятся по кровяному руслу в ткани другого типа (ткани-мишени), где оказывают своё биологическое действие (т. е. регулируют обмен веществ, поведение и физиологические функции организма, а также рост, деление и дифференцировку клеток) [18].

Кортизол - стероидный гормон с молекулярной массой 362 Да, является основным гормоном коры надпочечников. В крови кортизол циркулирует в основном в связанной с транскортином форме. Секреция кортизола подчиняется суточному ритму - максимальная концентрация кортизола в 6-9 ч утра, минимальная - в 22-24 ч. Количественное определение уровня кортизола в крови имеет диагностическое значение при оценке функционирования системы гипоталамус – гипофиз - кора надпочечников [37]. В своей структуре имеет стероновое ядро. Кортизол является регулятором углеводного обмена организма, а также принимает участие в развитии стрессовых реакций [18].

Выделившийся в кровь кортизол достигает клеток-мишеней (в частности, клеток печени). Благодаря своей липофильной природе легко проникает через клеточную мембрану в цитоплазму и ядро, где связывается со специфическими рецепторами. Гормон-рецепторный комплекс является фактором транскрипции - активирует транскрипцию определённых участков ДНК. В результате синтез глюкозы в гепатоцитах усиливается, тогда, как в мышцах снижается распад глюкозы. В клетках печени глюкоза запасается в виде гликогена. Таким обра-

зом, эффект кортизола состоит в сохранении энергетических ресурсов организма.

Кортизол оказывает противовоспалительное действие и уменьшает гиперчувствительность организма к различным агентам, супрессивно действуя на клеточный и гуморальный иммунитет. Способствует уменьшению количества эозинофилов и лимфоцитов в крови при одновременном увеличении нейтрофилов, эритроцитов и тромбоцитов. По принципу негативной обратной регуляции повышение уровня кортизола в крови снижает секрецию кортиколиберина [8].

Тироксин - тироидный гормон с молекулярным весом 777 Да, является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. Т4 циркулирует в крови в свободной и связанной форме - с тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), тироксинсвязывающим преальбумином и альбумином. Количественное определение концентрации тироксина в крови имеет диагностическое значение при оценке функционального состояния щитовидной железы [26].

В щитовидной железе синтезируются тиреоидный гормон - тироксин (Т4). Для синтеза этого гормона необходим иод, который активно захватывается из крови клетками фолликулов щитовидной железы. Тироксин являются производным аминокислоты тирозина. Тироксин содержит в своей молекуле 4 атома иода.

В крови тиреоидные гормоны связываются с белком - переносчиком и в таком виде транспортируются в ткани-мишени. Ткани-мишени для тиреоидных гормонов - это все ткани, кроме селезёнки и семенников. В тканях-мишенях тиреоидные гормоны освобождаются от белка и поступают в клетку. Действие тиреоидных гормонов на организм зависит от концентрации этих гормонов в крови: в физиологических дозах они оказывают анаболическое действие, в больших дозах - катаболическое.

Действие Т4 на синтез белка. Через рецепторы цитоплазмы гормон действует на хроматин ядра, в результате чего увеличивается синтез нуклеиновых кислот (ДНК, мРНК) и белка. Наработка новых молекул белка ускоряет рост, де-

ление и дифференцировку клеток, что особенно важно для растущего организма.

Тиреоидные гормоны абсолютно необходимы для структурного, биохимического и функционального созревания мозга. Считают, что в ЦНС клетки продолжают делиться в течение 1-1,5 лет после рождения. Поэтому если в этот период или еще до рождения возникает дефицит тиреоидных гормонов (гипотиреоз), это приводит к снижению синтеза белка во всем организме и, в частности, в мозговой ткани, нарушается процесс дифференцировки коры больших полушарий и мозжечка, и развивается умственная и физическая отсталость [17, 18].

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы исследования

Объектом исследований являлась плазма и сыворотка больных. Контрольную группу составили здоровые люди. Пробы предоставлялись институтом «НИИ медицинских проблем Севера». Были определены уровни церулоплазмина у 21 здоровых людей, 13 с ишемической болезнью сердца, 11 больных раком почек, 21 с диффузно-токсическим зобом, 19 с панкреатитом и 4 с перитонитом.

С-реактивный белок был определен у 14 больных раком почек, 22 с диффузно-токсическим зобом, 4 больных распространенным гнойным перитонитом, 4 с панкреатитом и у 7 с ишемической болезнью сердца.

Уровень церулоплазмина определяли в плазме крови по методу Равина. Для определения С-реактивного белка в сыворотке крови был использован метод латекс-теста.

3.2. Метод определения церулоплазмина по методу Равина

Принцип метода основан на окислении р-фенилендиамина при участии ЦП.

Реактивы:

0.5% водный раствор солянокислого р-фенилендиамина.0.4 М ацетатный буфер, pH 5.5. Готовят из двух растворов:

1) 54.44 г ацетата натрия растворяют в 1л дистиллированной воды;

2) 22.6 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 1л.

Полученные растворы смешивают в отношении 9:1 в большом количестве.

3% раствор фтористого натрия. После растворения соли в дистиллированной воде раствор профильтровывают.

Ход определения:

В пробирки вносят по 8 мл ацетатного буфера и 0.1 мл плазмы. В контрольную пробирку добавляют 2 мл раствора фтористого натрия (для инактивации ферментативной активности ЦП). Затем во все пробирки вносят по 1 мл раствора р-фенилендиамина (используемого в качестве субстрата). Пробирки встряхивают, помещают в термостат и инкубируют в течение часа при температуре 37°С. После инкубации во все пробирки (за исключением контрольной) добавляют по 2 мл раствора фтористого натрия. Содержимое пробирок перемешивают, затем их переносят в холодильник, где выдерживают 30 мин при 4°С. Пробы колориметрируют против контроля (бледно-розовой окраски) в кюветах с шириной слоя 1,0 см при L = 530 нм.

Умножая значение оптической плотности на коэффициент пересчета 875, получают величину концентрации ЦП в мг/л.

3.3. Метод определения С-реактивного белка латекс-агглютинации

Принцип метода:

Латекс-агглютинация может использоваться как быстрый полуколичественный метод определения СРБ. Его назначение - скрининг повышенных концентраций, после чего следует перейти к мониторингу с использованием количественных методов.

Определение содержания С-реактивного белка (СРБ) основано на взаимодействии СРБ исследуемой пробы со специфическими антителами против СРБ человека, иммобилизованными на поверхности латексных частиц. При смешивании анти-СРБ латекса с сывороткой крови, содержащей СРБ в концентрации превышающей 6 мг/л, в результате реакции между антителами к СРБ и СРБ развивается визуально регистрируемая агглютинация латексных частиц, что свидетельствует о положительной реакции пробы.

Для полуколичественного определения СРБ анализируются последовательные разведения исследуемого образца. Об уровне СРБ судят по последнему разведению (титру), при котором была выявлена визуально определяемая агглютинация.

Состав набора и условия хранения:

1. Реагент № 1. Анти-СРБ латекс (2 мл);

2. Реагент № 2. Буфер (10 мл);

3. Реагент № 3. Позитивный калибратор - концентрация СРБ > 6 мг/л (0,1 мл);

4. Реагент № 4. Пограничный калибратор - концентрация СРБ ~ 6 мг/л (0,2 мл);

5. Реагент № 5. Негативный калибратор - концентрация СРБ < 6 мг/л (0,2 мл);

6. Тест-пластина и шпатели

Реагенты стабильны при температуре хранения 2-8 °С в течение 18 месяцев.

Подготовка реагентов к процедуре анализа:

Оптимальная температура реагентов и окружающей среды при проведении анализа 22-25 °С возможно получение ложных результатов.

Анти-СРБ латекс перед использованием следует перемешать осторожным встряхиванием.

Процедура определения:

Качественное определение.

Раскапать по 20 мкл в лунки тест-пластины исследуемые образцы и реагенты, используя каждый раз одноразовые наконечники пипеток, набирая образцы сыворотки:

– №№1-10 - исследуемые образцы сыворотки

– в лунку (+) - реагент №3 (позитивный калибратор)

– в лунку (+/–) - реагент №4 (пограничный калибратор)

– в лунку (–) - реагент №5 (негативный калибратор)

Рядом с первой каплей во всех лунках поместить по 20 мкл реагента №1 (латекс суспензии). Смешать содержимое двух капель в лунке до гомогенного состояния, охватывая всю поверхность лунки. Для каждой лунки использовать одноразовый шпатель (зубочистку, спичку). Вращать тест-пластинку вручную или на механической мешалке со скоростью 80-100 об/мин в течение 2 минут. Развитие процесса агглютинации необходимо наблюдать в промежутке со 2-ой по 3-ю минуту от момента начала вращения тест-пластины. Затягивание процесса считывания результата может привести к регистрации ложной агглютинации, возникающей в процессе подсыхания реакционной смеси.

Оценка результатов:

Четко видимые агрегаты латексных частиц свидетельствуют о концентрации СРБ > 6 мг/л; мелкие агрегаты - о концентрации близкой к 6 мг/л; равномерно-гомогенная молочная суспензия указывает на концентрацию СРБ ниже 6

мг/л - результат отрицательный или ниже предела обнаружения используемого метода.

Полуколичественное определение.

Приготовить разведения исследуемых проб с помощью реагента №2 (буфера) в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 - Разведение исследуемых проб реагентом №2

Соотношение исследуемая проба/буфер	Содержание СРБ (мг\л), (С)
1:1	12<С<18
1:2	18<С<24
1:3	24<С<30
1:4	30<С<36
и т.д.	

Затем уже с каждым разведением проводить исследование в соответствии с качественным анализом. Конечным результатом считать пробу с наибольшим разведением, давшим реакцию агглютинации.

Нормальные значения: до 6 мг/л.

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) – это лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов, а также иммуноглобулинов и гормонов.

Метод ИФА обладает высокой чувствительностью и специфичностью, которая в настоящее время составляет более 90%.

Достоинства иммуноферментного анализа (ИФА):

Относительно высокая чувствительность (точность).

Приемлемая стоимость.

Позволяет проводить раннюю диагностику (благодаря возможности определения классов иммуноглобулинов при анализе).

Позволяет отслеживать динамику инфекционного процесса (благодаря возможности определения классов иммуноглобулинов).

Удобство в работе.

Иммунологический анализ крови позволяет получить быстрый ответ.

Недостатки ИФА анализа крови:

Иногда иммуноферментный анализ дает ложноположительные или ложноотрицательные результаты [12].

3.4. Определение концентрации кортизола методом иммуноферментного анализа

Принцип метода:

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и коньюгата кортизол-пероксидаза, во время инкубации происходит конкурентное связывание сывороточного кортизола и кортизола коньюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к кортизолу, иммобилизированными на внутренней поверхности лунок планшета.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами коньюгата кортизол-пероксидаза, причем количество связанного антителами коньюгата обратно пропорционально концентрации кортизола в анализируемом образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами коньюгата кортизол-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация кортизола в исследуемых образцах.

Состав набора «ДС-ИФА-Стероид-Кортизол»:

- Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к кортизолу;
- Коньюгат - кортизол, меченный пероксидазой хрена;
- Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 - калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества кортизола;
- Контрольная сыворотка - на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола;
- ПР (концентрат х 25) - промывочный раствор, концентрат;
- ТМБ-Субстратный раствор;
- Стоп-реагент/0,2М - серная кислота в концентрации 0,2 моль/л;
- Бланк для построения калибровочной прямой.

Подготовка реагентов:

Реагенты, готовые к применению

- Иммуносорбент;
- Стандартные калибровочные пробы;
- Коньюгат;
- Контрольная сыворотка;
- ТМБ-Субстратный раствор;
- Стоп-реагент.

Реагенты, требующие предворительного приготовления

Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной или деионизированной. Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий, промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течении 14 сут при комнатной температуре или 28 сут при температуре от 2 до 8 °С.

Проведение анализа

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора. В остальные лунки внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови в двух повторах.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

Во все лунки планшета, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл коньюгата, планшет закрыть крышкой или защитной пленкой.

Возможны две процедуры инкубации планшета:

Процедура 1 (термостатируемый шейкер, (37,0 ±0,5) °С);

Планшет инкубировать в течении 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре (37,0 ±0,5) °С.

Процедура 2 (комнатная температура)

После внесения в лунки планшета образцов и коньюгата содержимое перемешать аккуратным постукиванием по краям планшета в течении 30 секунд,

стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать в течении 60 минут при комнатной температуре (здесь 20-25 °С).

По окончании инкубации содержимое лунок удалить с помощью промывочного устройства в емкость для сбора инфицированного материала, планшет промыть 5 раз рабочим ПР, добавляя во все лунки планшета не менее 300 мкл рабочего ПР и удаляя рабочий ПР с помощью промывочного устройства в емкость для сбора инфицированного материала. После последнего промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Немедленно внести во все лунки планшета по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать при комнатной температуре в темноте:

Процедура 1: 20-30 мин.

Процедура 2: 20-30 мин.

Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

Учет результатов провести спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

3.5. Определение концентрации тироксина методом иммуноферментного анализа

Набор реагентов «ДС-ИФА-Тироид-Т4общий» предназначен для количественного определения общего тироксина (Т4общ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анадиза.

Принцип метода:

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. При добавлении

раствора 8-АНС-коньюгат Т4-пероксидаза и исследуемого образца, во время инкубации эндогенных Т4-общий сыворотки крови конкурирует с Т4, входящим в состав коньюгата, за связывание с моноклональными антителами к Т4, иммунобилизованными на внутренней поверхности лунок.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами Т4 и коньюгата Т4-пероксидаза, причем количество связанного антителами коньюгата обратно пропорционально количеству Т4 в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами коньюгата Т4-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация общего Т4 в исследуемых образцах.

Состав набора «ДС-ИФА-Тироид-Т4общий»:

- Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к тироксину;
- Коньюгат - тироксин (Т4), меченный пероксидазой хрена;
- Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 - калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества общего Т4;
- Контрольная сыворотка - сыворотка с известным содержанием общего Т4;
- 8-АНС - раствор 8-анилинонафтил-1-сульфокислоты - блокатор связывания Т4 с белками-переносчиками.
- ПР (концентрат х 25) - промывочный раствор, концентрат;
- ТМБ-Субстратный раствор;
- Стоп-реагент/0,2М - серная кислота в концентрации 0,2 моль/л;

- Бланк для построения калибровочной прямой.

Подготовка реагентов:

Реагенты, готовые к применению

- Иммуносорбент;
- Стандартные калибровочные пробы;
- Коньюгат;
- Контрольная сыворотка;
- ТМБ-Субстратный раствор;
- Стоп-реагент.

Реагенты, требующие предворительного приготовления

Рабочий промывочный раствор (ПР). Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной или деионизированной. Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий, промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течении 14 сут при комнатной температуре или 28 сут при температуре от 2 до 8 °С.

Рабочий раствор коньюгата-8-АНС - готовить перед использованием, смешать равные объемы растворов коньюгата и 8-АНС в зависимости от используемого количества стрипов. Рабочий раствор коньюгата-8-АНС, подготовленный к использованию, хранению не подлежит.

Проведение анализа

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП

ТМБ-Субстратного раствора. В остальные лунки внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови в двух повторах.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

Во все лунки планшета, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 200 мкл смешанного реагента (коньюгат-8-АНС), планшет закрыть крышкой или защитной пленкой.

Возможны две процедуры инкубации планшета:

Процедура 1 (термостатируемый шейкер, (37,0 ±0,5) °С);

Планшет инкубировать в течении 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре (37,0 ±0,5) °С.

Процедура 2 (комнатная температура)

После внесения в лунки планшета образцов и коньюгата содержимое перемешать аккуратным постукиванием по краям планшета в течении 30 секунд, стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать в течении 90 минут при комнатной температуре (здесь 20-25 °С).

По окончании инкубации содержимое лунок удалить с помощью промывочного устройства в емкость для сбора инфицированного материала, планшет промыть 5 раз рабочим ПР, добавляя во все лунки планшета не менее 300 мкл рабочего ПР и удаляя рабочий ПР с помощью промывочного устройства в емкость для сбора инфицированного материала. После последнего промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать при комнатной температуре в темноте:

Процедура 1: 15-20 мин.

Процедура 2: 15-20 мин.

Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

Учет результатов провести спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БОФ - белки острой фазы

ИФА - иммуноферментный анализ

СРБ - С-реактивный белок

ЦП - церулоплазмин

БЛАГОДАРНОСТИ

Я выражаю глубокую признательность за помощь в процессе подготовки магистерской диссертации моему научному руководителю – доценту, кандидату биологических наук Гершкорон Фриме Ароновне за советы и ценные замечания в работе над диссертацией, за педагогический и научный подход, отличное знание предмета, что вдохновляло меня на выполнение данной работы.

Также я благодарю профессора, кандидата биологических наук Титову Надежду Митрофановну за ценные замечания и объективные вопросы по содержанию работы во время предзащиты.

Выражаю признательность институту «НИИ медицинских проблем Севера» за помощь в получении нами проб сыворотки и плазмы крови здоровых людей и людей с патологиями.

Хотелось бы выразить благодарность рецензенту работы – доктору биологических наук Коленчуковой Оксане Александровне за ее внимательный анализ проделанной работы и ее объективную рецензию, которая позволила улучшить готовую работу.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Аблаев, Н. Р. Клинически значимые биохимические показатели и их интерпретация [Электронный ресурс] / Н.Р. Аблаев, Ш.А. Бейсембаева // Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова. Алматы. – 2005. Режим доступа: http://www.kazlab.kz/index.php?option=com
2. Алешкин, В. А. Белки острой фазы и их клиническое значение / В. А. Алешкин, Л. И. Новикова, А. Г. Мотов, Т.Н. Алешкина // Клиническая медицина, 2001. - №8 (66). - С. 39-48.
3. Марри, Р. Биохимия человека : учебник / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мэйес, В. Родуэлл. - Москва : Мир,1993. - Т1. - 384 с; - Т2. - 415 с.
4. Вавилова, Т. П. Роль церулоплазмина при развитии неопластических процессов / Т. П. Вавилова, Ю. Н. Гусарова, О. В. Королева, А. Е. Медведев // Биомед. химия. - 2005. - Т. 51, - № 3. - С. 263-275.
5. Вельков, В. В. Прокальцитонин и С-реактивный белок в лабораторной диагностике воспалительных процессов / В. В. Вельков // Лаборатория. Журнал для врачей. - Москва: ООО "Лабдиаг", 2012. - № 3. - С. 14-19.
6. Ганковская, Л. В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии: учеб. / Л. В. Ганковская, Л. В. Ковальчук, Р. Я. Мешкова. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 640 с.
7. Дайбанырова, Л. В. Клиническое значение С-реактивного белка и церулоплазмина у больных ишемической болезнью сердца : автореф. дис. канд. мед. наук.: 14.00.06. / Л. В. Дайбанырова. - Москва, 2007. - 23 с.
8. Дедов, И. И. Эндокринология : учебник / И. И. Дедов, Г. А. Мельниченко, В. В. Фадеев. - изд. 2-е, перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 432 с.

9. Долгов, В. В. Электрофорез в клинической лаборатории: производств. - практич. изд., практич. рук-во / В. В. Долгов, Г. А. Олефиренко, О. П. Шевченко. - Москва : Реафарм, 2006. - 158 с.

10. Ермолаева, Е. Н. Церулоплазмин - эндогенный регулятор функционального состояния тромбоцитов / Е. Н. Ермолаева, Л. В. Кривохижина, С. А. Кантюков, В. П. Яковлева. - Челябинск: 1ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2014. - № 7 - С. 492-495.

11. Каримов, И. З. Изменение содержания С-реактивного белка и других белков острой фазы в крови больных вирусным гепатитом / И. З. Каримов, М. М. Шавловский, П. Г. Назаров. - Санкт-Петербург : ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, 2004. - Т 3, - № 4 - С. 42-46.

12. Кишкун, А. А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике / А. А. Кишкун. // ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. - 536 с.

13. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей / В. Долгов [и др.]. - Москва, 2003.

14. Комар, С. И. Динамика α_1-антитрипсина и α_2-макроглобулина у больных остро текущей и затяжной пневмонией / С. И. Комар // Вопросы медицинской химии. - Москва : Изд-во МГУ, 1997. - № 4. - С. 46-49.

15. Кухта, В.К. Белки плазмы крови / В. К. Кухта, Э. И. Олецкий, А.Н. Стожаров // Патохимия и клиническое значение : Справочник. - Минск : Беларусь, 1996.

16. Лифшиц, В. М. Биохимические анализы в клинике: справочник / В.М. Лифшиц, В. И. Сидельникова - изд. 2-е. - Москва : МИА, 2001. - 303 с.

17. МакДермотт, М. Т. Секреты эндокринологии : учебное пособие / М. Т. МакДермотт. - Москва : Бином, 2010. - 584 с.

18. Масловская, А. А. Биохимия гормонов : пособие для студентов педиатрического, медико-психологического, медико-диагностического факульте-

тов и факультета иностранных учащихся, 6-е изд. / А. А. Масловская. – Гродно : ГрГМУ, 2012. - 44 с.

19. Медведев, В. В. Клиническая лабораторная диагностика: справочник для врачей / В. В. Медведев, Ю. З. Волчек ; под общ. ред. В. А. Яковлева. - Санкт-Петербург : Гиппократ, 2006. - 360 с.

20. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / под ред. проф. И. П. Кондрахина. - Москва : КолосС, 2004. - 520с.

21. Морозова, В. Т. Значение общеклинических исследований в диагностике заболеваний / В. Т. Морозова, Р. Л. Марцишевская, И. И. Миронова и др. // Клин. лаб. диагностика. - 2002. - № 6. - С. 101-104.

22. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. - Москва : Медицина, 2005. - 542 с.

23. Назаров, П. Г. Иммунологические нарушения, связанные с дефицитом С-реактивного белка в организме / П. Г. Назаров // Иммунология. - 2004. - № 3. - С. 33-37.

24. Назаров, П. Г. Реактанты острой фазы воспаления / П. Г. Назаров. - Санкт-Петербург : Наука, 2001. - 423 с.

25. Пауков, В. С. Роль нейтрофилов и макрофагов в локализации гноеродной инфекции / В. С. Пауков // Архив патологии. - 1996. - № 3. - С. 30-38.

26. Полотнянко, Л. И. Клиническая химия: [учеб. пособие] / Л. И. Полотнянко. - Москва: ВЛАДОС-ПРЕСС, 2008. - 343 с.

27. Санина, О. Л. Биологическая роль церулоплазмина и возможности его клинического применения. Обзор литературы / О. Л. Санина, Н. К. Бердинских // Вопр. мед. химии. - 1986. - Т. 32. - № 5 - С. 7-14.

28. Столяров, И. Д. Иммунодиагностика и иммунокоррекция в клинической практике / под ред. И.Д. Столярова. - Санкт-Петербург : СОТИС, 1999. - 176 с.

29. Творогова, М. Г. Железо сыворотки крови: диагностическое значение и методы исследования / М. Г. Творогова, В. И. Титов //Лаб. дело. - 2003. - № 3. - С. 3-10.

30. Титов, В. Н. Диагностическое значение повышение уровня С-реактивного белка «в клиническом» и «субклиническом» интервалах / В. Н. Титов // Клиническая лабораторная диагностика. – Москва : Медицина, 2004. - № 6. - С. 3-10.

31. Тонких, А. В. Гипоталамо-гипофизарная область и регуляции физиологических функций организма / А. В. Тонких. – 2008. – С. 146-161.

32. Чиркин, А. А. Диагностический справочник терапевта: клинические симптомы, программы обследования больных, интерпритация данных / А.А.Чиркин, А. Н. Окороков, И. И. Гончарик. - Минск: Беларусь, 2013. - 688 с.

33. Чукаева, И. И. Инфаркт миокарда и воспаление / И. И. Чукаева, О.Т.Богова, И. М. Корочкин, В. А. Алешкин // Научный обзор. : НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского. - 2007. - №4(11). - С. 19-23.

34. Abernathy, T. J. The occurrence during acute infection of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patient’s sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C-polysaccharide of pneumococcus / T. J. Abernathy, O. T. Avery // J. Exp. Med. - 1991. - Vol. 73. - P. 173-181.

35. Baumann, H. The acute phase response / H. Baumann, J. Gauldie // Immunologie Today. - 2004. - No2. - P 74-80.

36. Bruins, P. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia / P. Bruins, H. te Velthuis, A. P. Yazdanbakhsh // Circulation. - 2007. - Vol. 96. - № 10. - P. 3542-3548.

37. Calfee, J. E. An Exploratory Analysis of Pharmaceutical Drugs as Basic Research Tools / J. E. Calfee, E. DuPré // Drug Information Journal. - 2012. - Vol. 46. - P.192-196.

38. Chen, J. MMDB: Entrezqs 3D - structure database / J. Chen, J. B. Anderson, C. DeWeese-Scott et al. // Nucleic Acids Res. - 2003. - Vol. 31. - N 1. - P. 474-477.

39. Clyne, B. The C-reactive protein / B. Clyne, J. S. Olshaker // J. Emerg. Med. - 1999. - Vol. 17. - № 6. - P. 1019-1025.

40. Culotta, V. C. Disorders of copper transport. / V. C. Culotta, J. D. Gitlin // Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. - NY: McGraw-Hill, 2001. - Vol. 2 ed. - P. 3105-3126.

41. Dawson, J. H. Coordination environment and fluoride binding of type 2 copper in the blue copper oxidase ceruloplasmin. / J. H. Dawson, D. M. Dooley, H.B.Gray // Proc. Nat. Acad. Sci. - 2008. - Vol. 75. - N 9. - P. 4078-4081.

42. Harris, Z. L. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases / Z. L. Harris, V. Vassiliev, P. Zatta. - Brain Res. Rev, 2005. - Vol. 49, - №3. - P. 633-640.

43. Klomp, L. W. Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system / L. W. Klomp, Z. S. Farhangrazi, L. L. Dugan, J. D. Gitlin // J. Clin. Invest. - 2012. - Vol. 98. - N 1. - P. 207-215.

44. Koj, A. Metabolic studies of acute-phase proteins. Pathophysiology of plasma protein metabolism. - 2014. - P. 221-248.

45. Morell, A. G. Physical and chemical studies on ceruloplasmin V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo / A. G. Morell, R. A. Irvine, I.Sternlieb et al. // J. Biol. Chem. - 2008. - Vol. 243. - N 1. - P. 155-159.

46. Pan, Y. Expression of ceruloplasmin gene in human and rat lymphocytes / Y. Pan, K. Katula, M. L. Failla // Biochim. Biophys. Acta. - 2012. - Vol. 1307. – N2. - P. 233-238.

47. Reinhammar, B. «Blue» copper-containig oxidases. Copper proteins/ B. Reinhammar, G. Malmstrom Bo. - NY, 2011. - P. 109-149.

48. Sato, M. Detection of multiple forms of human ceruloplasmin / M. Sato, M. L. Schilsky, R. J. Stockert et al. // J. Biol. Chem. - 1990. - Vol. 265. - N 5. - P. 2533-2537.

49. Sun, H. C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance / H. Sun, T. Koike, K. Hatakeyama, M. Shiomi // Am. J. Pathol. - 2005. - Vol. 167. - P. 1139-1148.

50. Thomas, T. Ceruloplasmin gene expression in the rat uterus / T. Thomas, A. Macpherson, P. Rogers // Biochim. Biophys. Acta. - 1995. - Vol. 1261. - N 1. - P.77-82.

51. Tillet, W. S. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus / W. S. Tillet, T. Jr. Francis // J. Exp. Med. - 2010. - Vol. 52. - P. 561-571.

52. Vassiliev, V. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases / V. Vassiliev, Z. L. Harris, P. Zatta // Brain Res. Rev. - 2005. - Vol. 49. - N 3. - P. 633-640.

53. Verbina, I. A. Isolation and partial characterization of molecular forms of ceruloplasmin from human bile / I. A. Verbina, L. V. Puchkova, V. S. Gaitskhoki, S.A. Neifakh // FEBS Lett. - 2012. - Vol. 298. - N 2, 3. - P. 105-108.

54. Yang, E. Cellular expression of ceruloplasmin in baboon and mouse lung during development and inflammation / E. Yang, W. E. Frichichs, L. De Graffenried et al. // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. - 1996. - Vol. 14. - N 2. - P. 161-169.