

А. П. Галяк, А. С. Ковкрак

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИПРОЛИНА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ В ОЦЕНКЕ ОБМЕНА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Научный руководитель: ассист. К. Г. Бурдашкина

Кафедра биоорганической химии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A.P. Galyak, A. S. Kovkrak

DETERMINATION OF HYDROXYPROLINE AND ASCORBIC ACID IN SALIVA TO ESTIMATE CONNECTIVE TISSUE METABOLISM

Supervisor: assist. K. G. Burdashkina

Department of Bioorganic Chemistry,

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме: Для диагностики заболеваний соединительной ткани определяют уровень свободного гидроксипролина и аскорбиновой кислоты в биологических жидкостях. В данной работе было установлено содержание данных биологических маркеров в ротовой жидкости. Определено, что содержание данных показателей в исследуемой группе выше нормальных значений.

Ключевые слова: Соединительная ткань, гидроксипролин, аскорбиновая кислота, слюна.

Resume: To diagnose connective tissue diseases the level of free hydroxyproline and ascorbic acid in biological liquid method is used. It was determined that amount of markers in given probe exceeds the normal percentage.

Key words: connective tissue, hydroxyproline, ascorbic acid, saliva.

Актуальность. В последние годы внимание врачей-клиницистов привлекает проблема распространенности заболеваний соединительной ткани, среди которых абсолютное большинство - это различные виды дисплазии (ДСТ). Различают дифференцированную и недифференцированную ДСТ. Для дифференцированной дисплазии характерны определенный тип наследования, отчетливая клиническая картина, нередко — установленные и достаточно хорошо изученные генные и биохимические дефекты. К последней группе заболеваний относятся синдромы Марфана, Элерса-Данло, Альпорта, несовершенный остеогенез и др. Недифференцированную ДСТ диагностируют тогда, когда набор фенотипических и других признаков у пациента не укладывается ни в одно из дифференцированных заболеваний [1,2].

Если частота встречаемости синдромов дифференцированной дисплазии относительно не высока (например, классический тип синдрома Эрлеса-Данло встречается с частотой 2-5 на 100000) [3], то по данным исследований, анализ встречаемости основных фенотипических маркеров недифференцированной дисплазии выявил их наличие у 39,1 % молодых людей [4], что говорит об актуальности поиска биологических маркеров для ранней диагностики ДСТ.

Основным компонентом соединительной ткани является белок коллаген, различные формы которого составляют 25% от общего количества белка в организме. Молекула коллагена состоит из 3 полипептидных цепей, расположенных в виде правозакрученных α -спиралей. Первичная структура полипептидной цепи коллагена

содержит повторяющиеся триплеты – Gly-X-Y. Глицин является каждым третьим аминокислотным остатком. Пролин встречается в положениях X, 4-гидроксипролин – в положение Y. Гидроксипролин является специфической для коллагена и эластина аминокислотой. Он образуется посттрансляционно как продукт гидроксилирования остатков пролина под воздействием фермента пролилгидроксилазы. Примечательная особенность этой реакции состоит в том, что для ее осуществления необходим восстановительный агент, а именно аскорбиновая кислота, благодаря которой сохраняется ферроформа атома железа. Таким образом, аскорбиновая кислота выступает в качестве кофермента реакции гидроксилирования [5].

При нарушении процессов синтеза и интенсивной деструкции коллагена уменьшаются поперечные связи в фибриллах, что приводит к возрастанию содержания легкорастворимого коллагена, поэтому у больных с нарушенным метаболизмом соединительной ткани увеличивается содержание в биологических жидкостях его свободной фракции и уменьшается содержание связанной фракции. Таким образом, можно считать свободную фракцию гидроксипролина маркером деструкции соединительной ткани.

Как отмечалось ранее, аскорбиновая кислота также принимает участие в синтезе коллагена в качестве кофермента. Следовательно, уровень витамина С также может быть рассмотрен как маркер патологических процессов в соединительной ткани.

Цель: определить уровни 4-гидроксипролина и аскорбиновой кислоты в смешанной нестимулированной слюне у условно здоровых людей (n=15).

Задачи:

1. Определить уровень аскорбиновой кислоты в смешанной слюне исследуемой группы (n=15).
2. Определить уровень свободного гидроксипролина в смешанной слюне исследуемой группы (n=15).

Материал и методы. В качестве материала исследования использовали нестимулированную смешанную слюну условно здоровых людей (студенты 1 курса БГМУ) в возрасте 17-20 лет (n=15). Взятие слюны осуществляли не менее чем через час после принятия пищи и через 10 минут после полоскания ротовой полости теплой водой. Определение уровня аскорбиновой кислоты проводилось немедленно в связи с быстрым разрушением данного соединения.

Предварительно проводили депротенизацию слюны в 20% ТХУ. В центрифужную пробирку добавляли 1,5 мл слюны и 500 мкл 20% ТХУ. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Количественное определение аскорбиновой кислоты проводилось по методу Тильманса в супернатанте по реакции с 2,6-дихлорфенолиндофенолом. 1,5 мл супернатанта переносили в коническую колбу и титровали 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления устойчивого розового окрашивания.

Определение уровня свободного гидроксипролина проводилось методом спектрофотометрии. В центрифужную пробирку добавляли 250 мкл слюны и 1,25 мл абсолютного этанола, после центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. В мерную пробирку вносили 1 мл надосадочной жидкости, затем при перемешивании

приливали 250 мкл изопропанола и 250 мкл раствора 7% хлорамина. Через 4 минуты добавляли 750 мкл раствора реактива Эрлиха (раствор парадиаминдензальдегида). После помещали на водяную баню при 60 °С на 30 минут. Затем растворы охлаждали и определяли уровень свободного гидроксипролина методом спектрофотометрии против контроля при 558 нм.

Результаты и их обсуждение. В реакции с 2,6-дихлорфенолиндофенолом аскорбиновая кислота проявляет восстановительные свойства и легко окисляется с образованием дегидроаскорбиновой кислоты. При этом 2,6-дихлорфенолиндофенол в кислой среде в присутствии аскорбиновой кислоты переходит в восстановленную форму, о чем и свидетельствует постепенное исчезновение синего окрашивания 2,6-дихлорфенолиндофенола и появление светло-розового окрашивания его восстановленной формы (рисунок 1).

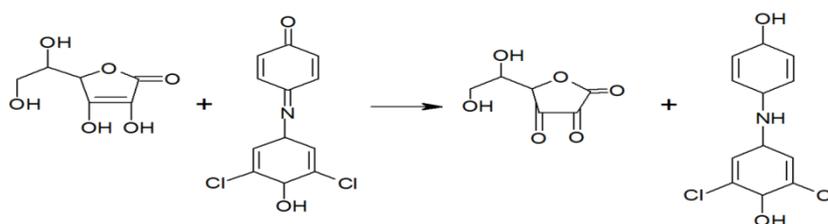


Рис. 1 – Взаимодействие аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом

Свободный гидроксипролин вступает в реакцию конденсации с парадиаминобензальдегидом с образованием интенсивно окрашенного комплекса (рисунок 2).



Рис. 2 – Реакции превращения пролина в оксипролин

Для расчета концентраций свободного гидроксипролина в образцах была построена калибровочная кривая, которая отображает зависимость между оптической плотностью образцов и содержанием в них свободного гидроксипролина (мкг\мл). Расчет концентраций свободного гидроксипролина проводили по уравнению регрессии $y=0,0171x+0,0075$, $R^2 = 0,9963$. Было определено, что уровень свободного гидроксипролина в группе условно здоровых молодых людей: 0,916(0,819; 1,929) мкг/мл (норма <0,8 мкг/мл) [6] (рисунок 3).

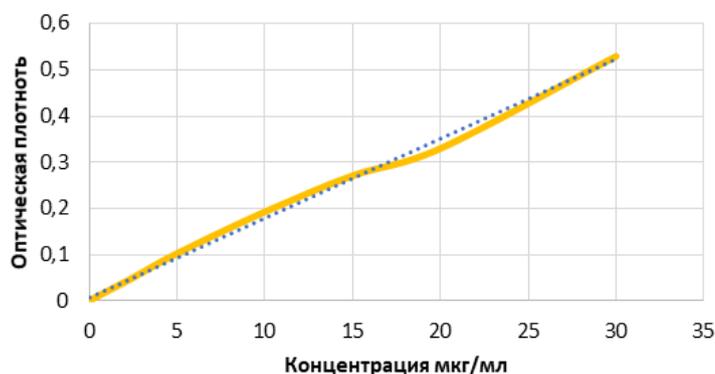


Рис. 3 – Калибровочная кривая для расчета концентраций свободного гидроксипролина

Для расчета уровня аскорбиновой кислоты использовалась следующая формула: $X = \frac{V_1 \cdot C_2 \cdot 176}{V_2 \cdot S}$, где X – уровень аскорбиновой кислоты в слюне (мг/мл), V_1 – объем супернатанта, взятого для титрования (мл), V_2 – объем 0,001н раствора краски Тильманса, затраченный на титрование 2 мл супернатанта, C_2 – концентрация раствора 2,6-дихлорфенолиндофенол (моль/л), 176 – молярная масса аскорбиновой кислоты (г/моль).

В результате исследования был определен уровень аскорбиновой кислоты в группе молодых условно здоровых людей, который составил 1,04 (1,02;1,05) мг/100 мл (норма 0,1 мг/100 мл) [7].

Выводы: Повышение уровня свободного гидроксипролина в слюне может свидетельствовать об интенсивности распада коллагена (предположительно тканей парадонта).

Значительное повышение уровня аскорбиновой кислоты в смешанной слюне исследуемой группы может быть вызвано приемом поливитаминных комплексов в период простудных заболеваний, а также неспецифичностью титриметрического метода анализа. Данный метод, основанный на реакции с 2,6-дихлорфенолиндофенолом, позволяет определять не только все формы аскорбиновой кислоты, но и родственные соединения, например, дикетогулоновую кислоту.

Литература

1. Лимаренко, М. П. Дифференцированная дисплазия соединительной ткани (клиническое наблюдение) / Лимаренко М. П. // Здоровье ребенка. – 2007. - №4. – С. 3-7.
2. Демидов, Р. О. Дисплазия соединительной ткани: современные подходы к клинике, диагностике и лечению / Р.О. Демидов, С.А. Лапшина, С.П. Якупова, Р.Г. Мухина // Инновационные технологии в медицине – 2015. - №4. –С. 37-40.
3. Василец, В.В. Частота встречаемости фенотипических признаков наследственных нарушений соединительной ткани у лиц молодого / В.В.Василец, Л.Л.Шебеко // Современные методы лечения наследственных и многофакторных нарушений соединительной ткани: материалы городской науч.-практ. конф. / Белорусский государственный медицинский университет / Под ред.проф. Е.Л. Трисветовой. - Минск, 2015. – С. 11-14.
4. Батова, Н.П. Синдром Эрлеса-Данло / Н. П. Батова // Студенческий научный форум: материалы X Международной студенческой научной конференции / Тюменский государственный медицинский университет. – Тюмень, 2018. – С.54-58.
5. Исследование пространственной структуры коллагена с применением методов многофотонной микроскопии и машинного обучения // Кистенев Ю. В., Вражнов Д. А., Николаев

ВВ. и др. / Успехи биологической химии – 2019. - № 59. - С. 219–252.

6. The serum and salivary level of malondialdehyde, vitamins A, E and C in patient with recurrent aphthous stomatitis / Khademi H., Khozeumeh F., Tavangar A. et al. // Advanced Biomedical research // Department of Oral Medicine, Torabinejad Dental Research Center, School of Dentistry, and Isfahan University of Medical Sciences. - Isfahan, 2014. - P.1- 4.

7. ВЭЖХ анализ пролина и 4-гидроксипролина в биологических жидкостях / Дутов А.А., Никитин Д.А., Мищенко М.Н. и др.// Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. - № 13. – С. 229-237.

Репозиторий БГМУ