

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УО «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ДОСТИЖЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ, КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦИИ

Материалы 67-ой научной сессии сотрудников университета

2-3 февраля 2012 года

ВИТЕБСК – 2012

УДК 616+615.1+378
ББК 5Я431-52.82я431
Д 70

Редактор:

Профессор, доктор медицинских наук В.П. Дейкало

Заместитель редактора:

доцент, кандидат медицинских наук С.А. Сушков

Редакционный совет:

Профессор В.Я. Бекиш, д.ф.н. Г.Н. Бузук, профессор В.С. Глушанко, профессор С.Н. Занько, профессор В.И. Козловский, профессор Н.Ю. Коневалова, д.п.н. З.С. Кунцевич, профессор Н.Г. Луд, д.м.н. Л.М. Немцов, профессор М.А. Никольский, профессор В.И. Новикова, профессор В.П. Подпалов, профессор М.Г. Сачек, профессор В.М. Семенов, профессор А.Н. Щупакова, доцент Ю.В. Алексеенко, доцент С.А. Кабанова, доцент Л.Е. Криштопов, доцент С.П. Кулик, доцент П.С. Васильков, доцент И.А. Флоряну.

Д 70 Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации.
Материалы 67-й научной сессии сотрудников университета. – Витебск:
ВГМУ, 2012. – 521 с.

ISBN 978-985-466-518-4

Представленные в рецензируемом сборнике материалы посвящены проблемам биологии, медицины, фармации, организации здравоохранения, а также вопросам социально-гуманитарных наук, физической культуры и высшей школы. Включены статьи ведущих и молодых ученых ВГМУ и специалистов практического здравоохранения.

УДК 616+615.1+378
ББК 5Я431+52.82я431

© УО «Витебский государственный
медицинский университет», 2012

ISBN 978-985-466-518-4

стически значимое снижение концентрации NO в интервалах времени от 7-11 до 17-21 часов после смерти. Полученные данные имеют прикладное значение для судебно-медицинской практики.

Литература:

1. Каштанов, С.И. Моно оксид азота в механизмах устойчивости сердечно-сосудистых функций при эмоциональном стрессе / С.И. Каштанов, М.А. Звягинцева, И.Л. Кошарская // Вестн. Росс. АМН. – 2000. – № 4. – С. 21-25.
2. Степанов, Ю.М. Аргинин в медицинской практике (обзор литературы) / Ю.М. Степанов [и др.] // Журн. АМН Украины. – 2004. – Т. 10. – Вып. 1. – С. 340-352.

3. Костогрыз, В.Б. Нарушения в системе цитокинов у больных хронической сердечной недостаточностью ишемической этиологии с имплантированным электрокардиостимулятором и возможности их коррекции / В.Б. Костогрыз // Укр. мед. альманах. – 2007. – № 10 (3). – С. 34-36.

3. Солодков, А.П. Фотометрический метод определения нитратов и нитритов в биологических жидкостях: инструкция по применению / А.П. Солодков [и др.]. – Утв. МЗ РБ № 91-0008 от 19.03.2001. – 6 с.

4. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2006. – 312 с.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ

Железняк Н.В., Сенькович С.А., Прищепенко В.А., Яцыно М.В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Актуальность. При ряде заболеваний, таких как системные заболевания соединительной ткани, инфаркты миокарда, злокачественные новообразования, в качестве одного из диагностических и прогностических критериев используется уровень ДНК-азной активности сыворотки крови [1, 2, 3]. Существующие в настоящее время методы количественного определения ДНК-азной активности, такие как метод риванолового сгустка, электрофоретические методы весьма трудоемки, сложны и дороги. Использование же только качественного определения ограничивает возможности применения ДНК-азной активности как диагностического критерия.

Цель. Разработать новый количественный метод оценки ДНК-азной активности в биологических жидкостях.

Материал и методы. Конфокальный микроскоп Leica TCS SPE для определения интенсивности люминесценции, спектрофотометр СФ-46. В качестве референс-метода использовали полуколичественную модификацию метода риванолового сгустка [4].

Результаты и обсуждение. Существующие методы определения нуклеазной активности построены на определении убывания с течением времени субстрата (ДНК) при взаимодействии с исследуемыми образцами. Ахиллесовой пятой этих методов является трудоемкость количественного определения остатка ДНК в реакционной смеси. В связи с этим, основные усилия в нашем исследовании мы направили на разработку нового метода количественного определения ДНК в растворах, содержащих несколько видов органических компонентов, таких, как белки, липиды, полисахариды.

Для определения количества ДНК в растворе, нами была использована конфокальная микроско-

пия [5]. Одним из преимуществ такой микроскопии является возможность регистрировать интенсивность люминесценции в численном выражении. В качестве специфического флюорохрома для ДНК мы использовали бромистый этидий. Этот фенантроновый краситель способен внедряться в двухнитевые участки нуклеиновых кислот, при этом его флюоресценция резко усиливается. Важно, что этидия бромид не взаимодействует с другими соединениями помимо ДНК, что предотвращает искажение результатов из-за наличия в растворе посторонних примесей.

При определении количества ДНК в растворе мы готовили калибровочные растворы: 0,9% NaCl с разной концентрацией ДНК от 2 мг/мл до 0 мг/мл с шагом 0,2. Исследуемый и калибровочные растворы помещали в лунки стрипов разборных плоскодонных планшетов для ИФА в равных объемах (не менее 50 мкл) в лунке. Затем добавляли по 20 мкл раствора бромистого этидия в концентрации 1 мг/мл на каждые 50 мкл раствора в лунках и тщательно перемешивали автоматической пипеткой. После 30-минутной инкубации при 37°C производили последовательное сканирование в режиме XYZ исследуемых и калибровочных лунок лазером с длиной волны 405 нм в 3 параллельных плоскостях сканирования - на высоте 20, 50 и 100 мкм над дном лунки. Далее посредством специальной программы в числовом выражении оценивали интенсивность флюоресценции в каждой плоскости и определяли среднее значение для каждой лунки. Зависимость концентрации ДНК от интенсивности люминесценции имела линейный характер и описывалась уравнением $K=4,7-2,98x$ ИЛ, где K – концентрация ДНК, ИЛ – интенсивность люминесценции; $R_{cor}=-0,996$, $R_{sq}=99,26\%$.

Предложенная методика для определения ко-

личества ДНК достаточно проста, не требует значительных затрат на расходные материалы, однако ее широкое применение ограничивается высокой стоимостью конфокального микроскопа. В связи с этим нами предложен другой способ оценки количества ДНК в растворе и опытным путем установлено, что оптическая плотность смеси ДНК с этидием бромидом при длине волны 450 нм пропорциональна концентрации ДНК. На основании этих данных нами был разработан метод для оценки ДНК-азной активности в биологических жидкостях.

При пробных постановках метода в качестве фермента мы использовали препарат дезоксирибонуклеазы поджелудочной железы крупного рогатого скота. Опытным путем мы пришли к следующему составу реакционной смеси: раствор ДНК на трис-НСI буфере pH 7,4 0,02 М в концентрации 1 мг/мл с добавлением MgCl₂ до концентрации 0,02 ммоль/л в количестве 180 мкл; раствор ДНК-азы на 0,9% растворе NaCl в количестве 50 мкл. В качестве отрицательного контроля использовали 0,9% раствор NaCl. Реакционную смесь инкубировали в лунках планшет для иммуноферментного анализа в течение 5 часов 30 минут при 37,0 С. После инкубации к реакционной смеси добавляли 50 мкл 0,1% раствора этидия бромидом на 0,02 М трис-НСI буфере pH 7,4. После 30 минутной инкубации проводили учет результатов реакции на многоканальном спектрофотометре при длине волны 450 нм. Чувствительность метода составила 500 нг фермента ДНК-азы на миллилитр реакционной смеси.

В качестве референс-метода использовали количественную модификацию метода риванолового сгустка. При определении ДНК-азной активности методом риванолового сгустка активность достоверно

регистрировалась при концентрации ДНК-азы 1 мкг/мл, а разработанным нами методом – 0,5 мкг/мл. При определении внутрианализной воспроизводимости коэффициент вариации составил 10,18%, межанализной – 10,7 %.

Выводы.

1. Нами предложен простой и доступный метод определения ДНК-азной активности по интенсивности флуоресценции остатка ДНК с возможным учетом на конфокальном микроскопе или спектрофотометрически.

2. После апробации метода с различными биологическими средами возможно его внедрение в лабораторную практику.

Литература:

1. Сидорская, Е.В. ДНКазная активность препаратов сывороточных IgG при заболеваниях щитовидной железы / Е.В. Сидорская, И.И. Генералов, А.Н. Окороков // Мед. новости. – 2000. - №5. – С. 72-74.

2. Suchkov, S.V. Comparative study of catalytic (DNA-hydrolyzing) and cytotoxic properties of anti-DNA autoantibodies / S.V. Suchkov // Bull. Exp. Biol. Med. – 2001. – Vol. 131, № 4. – P. 353–354.

3. ДНК–гидролизующие антитела при лимфо-пролиферативных заболеваниях / А.В. Козырь [и др.] // Бюлл. эксп. биол. мед. – 1996. – № 2. – С. 204–206.

4. Способ определен ДНК-азной активности: пат. 1066 Респ. Беларусь, МСI С12Q 1/34, С12N 9/22. / М.Р. Конорев, К.С. Азаренок, И.И. Генералов, А.Г. Голубева (РБ); заявитель Вит. гос. мед. ун-т. – № 243 А; заявл. 06.04.93; опубл. 14.08.96.

5. Незлин, Л. Руководство для работы на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SPE/ Л. Незлин // Москва – 2008. – 34 с.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО – МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРЫ МОЗЖЕЧКА ПРИ АДАПТАЦИИ К ПЕРИОДИЧЕСКОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И ИШЕМИИ

Ким Т.И., Самсонова И.В., Бурак Г.Г., Кузнецов В.И.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Актуальность. Интерес к изучению морфолого-функциональных основ мозжечковых расстройств при адаптации к гипобарической гипоксии и ишемии определяется многими обстоятельствами, важнейшие из которых:

1) долговременная, постепенно развивающаяся и достаточно надежная адаптация является необходимой предпосылкой расширения деятельности человека в экстремальных условиях среды и важным фактором повышения резистентности здорового организма и профилактики болезней [1];

2) мозжечковые расстройства во многом определяют клинику, течение и исходы ишемии ствола

мозга, развивающиеся вследствие недостаточности вертебро-базилярного кровообращения [2];

3) структурная организация сосудисто-нервных образований мозжечка, их множественные связи и разнообразие функции во многом определяют состояние организма в условиях относительного покоя и при заболеваниях.

Цель. В модельных опытах на животных изучить нарушения структуры микрососудов и нейронов коры мозжечка при адаптации к гипобарической гипоксии и ишемии головного мозга стволовой локализации.

Материал и методы. Опыты с адаптацией про-