

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА ХИТИНАЗУРА.

С.А.ПИСАРЖЕВСКИЙ, А.Г.ГЛОБА, О.Н.ШИРШОВ, А.И.МАРЧУК,
А.М.СВЕТУХИН, А.А.КАРЕЛИН

Институт хирургии им. А.В.Вишневского РАМН, г.Москва, 113093, Б.Серпуховская ул., 27

Описан метод определения активности лизоцима в сыворотке крови с использованием в качестве субстрата коллоидного хитиназура. Основой инкубационной среды являлся 0,1 М ацетатный буфер, рН 5,0. Об активности лизоцима судили по флуоресценции азура при 650 нМ (Длина волны возбуждающего света 558 нм) в инкубационной среде в конце трехчасовой инкубации при 37°C после отделения непрореагировавшего хитиназура кратковременным центрифугированием. Показано, что развитие раневой инфекции сопровождается увеличением хитиназной активности лизоцима в сыворотке крови.

Ключевые слова: лизоцим, сыворотка крови, хитиназур, метод определения.

Введение. Лизоцим (3.2.1.17) — это фермент, расщепляющий гликозидную связь между 1-ым атомом углерода N-ацетилмурамовой кислоты и 4-ым атомом углерода N-ацетилглюкозамина в полисахаридах клеточной стенки бактерий, что приводит к гибели микроорганизмов. Лизоцим считается одним из основных компонентов неспецифической защиты организма, связанной с функцией моноцитарно-макрофагальной системы, филогенетически более старой, чем лимфоцитарно-плазматическая система, ответственная за специфический иммунитет. Фермент содержится у человека и животных в крови и других биологических жидкостях и тканях, синтезируясь в основном в клетках, способных к фагоцитозу, — гранулоцитах и макрофагах. Таким образом, активность лизоцима в крови является важным показателем интенсивности инфекционного процесса и состояния системы неспецифической защиты организма [1, 2].

Несмотря на несколько попыток приготовить простой, хорошо определенный субстрат для измерения активности лизоцима, ее продолжают определять в основном турбидиметрическим методом [1]. Он основан на регистрации убыли мутности стандартной суспензии бактерий *Micrococcus lysodeikticus* при добавлении к ней источника фермента [3]. В последние годы предложена его микромодификация [4]. Описан также радиоиммунологический метод определения количества лизоцима [5]. Таким образом, остается актуальной задача поиска биополимера, который мог бы служить субстратом при определении лизоцимовой активности. Между тем известно, что лизоцим обладает определенной хитиназной активностью (3.2.1.14.), т.е. способностью гидролизовать 1,4-β-N-гликозидные связи между остатками ацетилглюкозамина в хитине [1]. Одним из простых методов определения хитиназной активности является регистрация растворимых окрашенных продуктов реакции после инкубации источника фермента с субстратом, в котором хитин связан с красителем-азуром [6]. В литературе существует указание на попытку определять активность лизоцима в раневом экссудате с использованием в качестве субстрата хитиназура, однако авторы сообщения не описали своего метода [7].

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы мы поставили разработку метода определения лизоцимной активности в сыворотке крови с использованием в качестве субстрата хитиназура.

Методика. Кровь получали от доноров и больных с раневой инфекцией.

В опытах использовали хитиназуру фирмы "Sigma" (Англия). Из него приготавливали коллоидный раствор по описанной в литературе методике [8]. Хитиназуру растворяли в концентрированной соляной кислоте и полученный раствор нейтрализовали по каплям 1 М NaOH до pH 7,0. Хитиназуру осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин, а затем 3 раза промывали десятикратным объемом дистиллированной воды для освобождения от соли и неосаждаемых при данном режиме центрифугирования мельчайших частиц хитиназуры. Затем осадок растворяли в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,0, так, чтобы в 1 мл раствора содержалось 3 мг хитиназуры. Перед использованием раствор хитиназуры обрабатывали в гомогенизаторе Даунса (20 ударов поршня).

Определение активности лизоцима проводилось следующим образом. В инкубационный сосудик помещали 1,8 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,0; 1 мл раствора хитиназуры и 0,2 мл сыворотки крови. Таким образом, конечная концентрация хитиназуры в инкубационной среде составляла 1 мг/мл. Инкубацию проводили в течение 3 часов при температуре 37°C при постоянном встряхивании. Реакцию останавливали быстрым отделением непрореагировавшего субстрата в ходе кратковременного центрифугирования (5 мин, 1000 g). 1,5 мл супернатанта переносили в пробирку, куда было предварительно добавлено 1,5 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,0. В качестве контроля использовали пробы, в которых хитиназуру отделяли сразу после смешивания компонентов. Об активности лизоцима судили по разнице флуоресценции опытных и контрольных проб. Измерение флуоресценции проводили при 650 нм (длина волны возбуждающего света 558 нм) на спектрофлуориметре MPF-4 ("Hitachi", Япония). В качестве стандарта сравнения использовали раствор азур 1 в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,0 в концентрации 0,1 мкг/мл. Активность лизоцима выражали в мкг освободившегося в супернатанте азур 1 на 1 мл сыворотки за 1 час при 37°C. Такая единица хитиназной активности лизоцима была выбрана по аналогии с единицей, предлагаемой в работе [9]. Авторы выражали активность хитиназы в миллиграммах восстанавливающих сахаров, образующихся при гидролизе коллоидного хитина 1 мл культуральной жидкости за 1 час при 37°C.

Расчет активности лизоцима проводили по формуле:

$$\frac{(O-K) \cdot 0,1 \cdot 2 \cdot 5 \cdot 3}{СТ \cdot 3} = \frac{O-K}{СТ}$$

где O — отброс самописца флуориметра от нулевой точки в опытной пробе (в мм),

K — отброс самописца флуориметра от нулевой точки в контрольной пробе (в мм),

0,1 — концентрация азур 1 в стандартной пробе (в мкг/мл),

2 — разбавление инкубационной среды перед определением (безразмерная величина),

5 — во сколько раз активность лизоцима больше в 1 мл сыворотки, чем в 0,2 мл сыворотки (безразмерная величина),

3 (в числителе) — объем инкубационной среды (в мл),

СТ — отброс флуориметра от нулевой точки в стандартной пробе (в мм),

3 (в знаменателе) — время инкубации (в часах).

Результаты и обсуждение. При создании нового метода определения активности лизоцима надо было сначала подобрать среду инкубации. Оптимум активности лизоцима для его основного субстрата достигается при pH 6,2 [3], однако оптимум его активности по отношению к хитину достигается при pH 5,0 [10]. Поэтому за основу инкубационной среды мы взяли 0,1 М ацетатный буфер, pH 5,0.

Если один из реагентов находится в растворе, а другой в твердом состоянии, то скорость реакции будет пропорциональна площади раздела фаз. Поэтому для увеличения скорости реакции мы поставили перед собой задачу максимального диспергирования хитиназура. Перевести его в раствор невозможно, так как он растворим только в крепких кислотах [6]. Однако при определении хитиназной активности иногда используют коллоидный раствор хитина, который образуется при нейтрализации раствора хитина в крепких кислотах щелочью. Мы решили вводить в инкубационную систему коллоидный хитиназур. При стоянии наблюдается слипание частиц коллоида. Для того, чтобы размер коллоидных частиц был минимальным и стандартизированным, мы проводили обработку раствора хитиназура непосредственно перед опытом в гомогенизаторе Даунса.

Пробные эксперименты показали, что после окончания инкубации супернатанты совершенно бесцветны, и количества перешедшего в раствор окрашенного продукта совершенно недостаточно для спектрофотометрического определения. Тогда мы решили попробовать флуориметрический метод определения азура. Мы сняли спектры поглощения и флуоресценции азура 1 в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,0 и определили их максимумы соответственно при 558 и 650 нм. Сходный спектр поглощения и флуоресценции имели растворимые продукты деградации хитиназура при внесении в инкубационный сосудик богатого источника лизоцима — слезной жидкости.

Прикидочные эксперименты показали, что при внесении в инкубационный сосудик 0,2 мл сыворотки крови и при трёхчасовой продолжительности инкубации при 37°C образуется достаточное для флуориметрического определения количество растворимого флуоресцирующего продукта.

Теперь перед нами встал вопрос о способах остановки реакции и определении оптимальных условий регистрации флуоресценции. Использование кипячения для остановки реакции не подошло, так как по литературным данным лизоцим сохраняет активность при кипячении в кислой среде [11]. Кроме того, при кипячении раствор становится мутным, и от мутности не удавалось избавиться в ходе кратковременного низкоскоростного центрифугирования (1000 g, 15 мин). Использование же для остановки реакции ТХУ или хлорной кислоты не подошло потому, что в сильнокислой среде азур меняет цвет и характеристики флуоресценции. Поэтому мы решили останавливать реакцию отделением непрореагировавшего субстрата при помощи кратковременного центрифугирования (1000 g, 5 мин). Это время мало по сравнению с продолжительностью инкубации. Мы решили определять флуоресценцию продукта прямо в инкубационной среде после отделения субстрата, чтобы избежать уменьшения абсолютной величины флуоресценции вследствие разбавления раствора. Определение флуоресцирующего продукта реакции иногда применяется в энзимологии [12]. Для того, чтобы определить, не вызовет ли добавленная в инкубационный сосудик сыворотка гашения флуорес-

ценции, мы провели определение флуоресценции раствора азура 1 в концентрации 0,1 мкг/мл и раствора азура той же концентрации при добавлении к нему сыворотки в количествах, используемых нами в опытах. Мы обнаружили, что сыворотка не влияет на флуоресценцию азура. Для того, чтобы обеспечить заполнение стандартной кюветы флуориметра толщиной 1 см, требуется 2,5-3,0 мл жидкости. Поэтому для проведения анализа пришлось бы сливать весь супернатант. Однако при этом возможно взмучивание осадка. Для того, чтобы исключить загрязнение супернатанта и обеспечить заполнение кюветы флуориметра, мы решили отбирать 1,5 мл супернатанта и смешивать его с 1,5 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,0.

Необходимо было также показать, что в диапазоне наблюдаемых нами изменений концентрации азура имеет место линейная зависимость флуоресценции азура от его концентрации. Это было проделано нами в специальных экспериментах (рис. 1).

Необходимо было проверить, не является ли появление растворимого флуоресцирующего продукта результатом не ферментативной, а какой-нибудь неспецифической реакции, например, вымывания из субстрата при инкубации в условиях постоянного встряхивания мельчайших частиц хитиназура, неосаждаемых при используемых нами режимах центрифугирования. Для этого была проведена стандартная трехчасовая инкубация субстрата в буфере, но без добавления источника фермента. Было четко показано, что в этих условиях не происходит накопления флуоресцирующего продукта в супернатанте. Таким образом, было доказано, что мы регистрируем именно ферментативную реакцию.

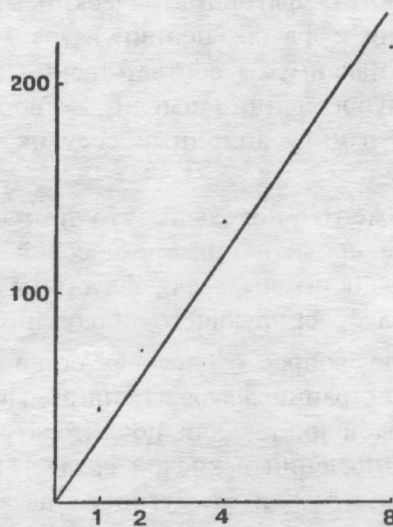


Рис. 1. Величина отброса пера самописца флуориметра от нулевой точки в зависимости от исследуемой концентрации раствора азура в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,0

По оси абсцисс — концентрация азура (в мкг/мл). По оси ординат — величина отброса пера самописца флуориметра от нулевой точки (в мм).

В специальных опытах нами было показано, что при используемых нами количествах сыворотки и времени инкубации имеет место линейная зависимость накопления флуоресцирующего продукта реакции в супернатанте от количества внесенного фермента. В инкубационные сосудики добавляли по 0,1, 0,2 или 0,4 мл сыворотки крови от больных с местной раневой инфекцией, 1 мл раствора хитиназура и соответственно 1,9, 1,8 и 1,6 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,0 так,

чтобы общий объем инкубационной среды составлял 3,0 мл. Инкубацию и определение концентрации азура в инкубационной среде после отделения непрореагировавшего хитиназура проводили так, как описано в разделе "Методика" (рис. 2).

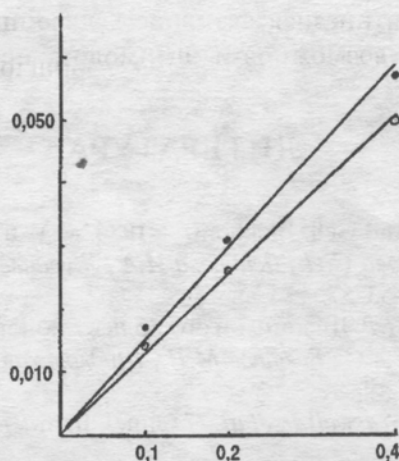


Рис. 2. Концентрация азура в инкубационной среде при добавлении в инкубационные сосудики различных количеств сыворотки больных с местной раневой инфекцией.

По оси абсцисс — количество добавленной в инкубационный сосудик сыворотки (в мл). По оси ординат — концентрация азура в инкубационной среде после проведения инкубации (в мкг/мл).

Кривая 1 — первый больной, кривая 2 — второй больной.

Разработанным методом мы определяли активность лизоцима у больных с острыми (флегмона) и хроническими (трофические язвы, остеомиелит) гнойными заболеваниями. При этом у 15 пациентов инфекция имела местный характер, а у 8 — отмечены выраженные проявления гнойно-резорбтивной лихорадки. Контролем служили исследования, проведенные у 14 доноров. Диапазон изменчивости активности лизоцима у доноров составил 0,03–0,09 мкг азура/мл сыворотки/час. По литературным данным он составляет 5–15 мг/л [3]. Таким образом, вариабельность активности лизоцима у доноров примерно соответствует вариабельности активности лизоцима, определенной турбодиметрическим методом. Нами было показано, что хитиназная активность лизоцима при раневой инфекции достоверно возрастает: доноры — $0,07 \pm 0,01$ мкг азура/мл сыворотки/час, больные с местной инфекцией — $0,16 \pm 0,02$ мкг азура/мл сыворотки/час ($P < 0,01$), больные с гнойно-резорбтивной лихорадкой — $0,18 \pm 0,03$ мкг азура/мл сыворотки/час ($P < 0,05$).

Попытка определить активность лизоцима в моче нашим методом не дала результатов. По литературным данным активность лизоцима в моче примерно в 20 раз ниже активности лизоцима в сыворотке крови [1].

Разработанный нами метод уступает по чувствительности турбодиметрическому методу, требует для проведения большего количества сыворотки (для определения активности лизоцима турбодиметрическим методом требуется 0,1 мл сыворотки [3], а его микромодифиции — 5–10 мкл [4]) занимает больше времени для выполнения (турбодиметрический метод — 0,5 часа [3]), требует более сложного оборудования (флуориметр, а не ФЭК) и дорогостоящих реактивов (хитиназур). Однако в нашем методе, в отличие от турбодиметрического, используемый субстрат более прост и лучше определен. Кроме того, наш метод позволяет опреде-

лять активность лизоцима на основании совершенно иного химического подхода. В нём хитиная активность лизоцима определяется по флуоресценции растворимых продуктов деградации хитиназура-субстрата, в котором хитин ковалентно связан с красителем азуром. Он является предпочтительным, когда исследователей интересует именно хитиная активность лизоцима. Таким образом, предлагаемый метод расширяет возможности энзимолога при изучении активности лизоцима в крови.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Jolles P., Jolles J. // Mol. and Cell. Biochem. — 1984. — V. 63. — P. 165-189.
- 2 Воложин А.И., Виноградова С.И., Денисова И.А., Журавлева Т.П. // Вопр. мед. химии. — 1993. — Т. 39, N 3. — С. 53-57.
- 3 Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. — Томск, 1974.
- 4 Баранов В.В., Прилуцкий А.С., Беляшов М.П., Щидловская М.П. // Лаб. дело. — 1991. — N 4. — С. 13-15.
- 5 Thomas M.J., Russo A., Graswell P. et al. // Clin. Chem. — 1981. — V. 27, N 7. — P. 1223-1226.
- 6 Hackman R.H., Goldberg M. // Anal. Biochem. — 1964. — N 8. — P. 397-401.
- 7 Knapp U., Picard-Manreau A., Rahn H.D. // Langenbecks Arch. fur Chir. — 1984. — Bd. 364. — S. 303-307.
- 8 Lingappa G., Lockwood Y.L. // Nature. — 1961. — V. 189, N 4759. — P. 158-159.
- 9 Слабоспицкая А.Т., Крымовская С.С. // Микробиол. журнал. — 1992. — Т. 54, N 6. — С. 16-22.
- 10 Страйер Л. // Биохимия: Пер. с англ. — М., 1985. — Т. 1-3.
- 11 The Enzymes. /Eds Boyer P.D., Lardy H., Myrback K. — 2-d Ed. — New York, London, 1960. — V. 4.
- 12 Юденфред С. Флуориметрический анализ в биологии и медицине: Пер. с англ. — М., 1965.

THE METHOD OF ESTIMATION OF LYSOZYME ACTIVITY IN SERUM WITH CHITIN AZURE AS SUBSTRATE.

S.A.Pisarzhevsky, A.G.Globa, O.N.Shirshov, A.I.Marchuk, A.M.Svetuhin, A.A.Karelin

Vishnevsky Institute of Surgery, Russian Academy of Medical Sciences, Bolshaya Seprukhovskaya 27, Moscow

The method of estimation of lysozyme activity in serum when chitin azure is used as substrate is described. The basis of incubation medium is 0,1 M acetate buffer, pH 5,0. It was judged about activity of lysozyme by fluorescence of azure in incubation medium at the end of three hour incubation at 37°C after separation of non-reacted chitin azure by short time centrifugation. It was shown that development of wound infection is accompanied by increasing of chitinase activity of lysozyme in serum.

Key words: lysozyme, serum, chitin azure, method of determination