

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «СЕВЕРО-ЗАПАДНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.И. МЕЧНИКОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России)

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ХИМИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ»

3 декабря 2020 г.

Часть 2



Санкт-Петербург 2020



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР КОМПАНИИ BECKMAN COULTER INT. S.A.

- Биохимические анализаторы
- Гематологические анализаторы
- Иммунохимические анализаторы
- Микробиологические анализаторы
- Анализаторы мочи
- Проточные цитофлуориметры
- Центрифуги
- Лабораторные роботы







ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР КОМПАНИИ INSTRUMENTATION LABORATORY

- Анализаторы газов крови и электролитов
 Анализаторы для исследования
 системы гемостаза
 - ≥ Реагенты для коагулометрии

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР КОМПАНИИ SARSTEDT



- Системы взятия венозной крови S-Monovette
- Контейнеры для биологических образцов
- □ Пробирки
- ≥ Наконечники для автоматических пипеток



ООО «ЛабТэк»

191186, г. Санкт-Петербург, а/я 238 Тел.: (812) 313-0203, факс: (812) 313-0204 www.labtech.su / labtech@labtech.su

Sigma-Aldrich



Время движется вперёд, наш уровень сервиса - тоже!

В 2015 году компания Sigma-Aldrich стала частью Life Science подразделения компании Merck.

Life Science подразделение компании Merck объединило в себе продукты и услуги мирового класса, инновационные возможности и исключительный талант компаний Merck Millipore и Sigma-Aldrich, став одним из мировых лидеров направления Life Science.

мы поддерживаем отечественную науку и предоставляем скидку до зох держателям грантов, выделяемых на проведение научных исследований

При заказе просим вас ссылаться на код или наименование проекта

Пришлите запрос на ruorder@merckgroup.com, в теме письма укажите "Грант" и получите скидку до 30%



Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ХИМИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ»

Санкт-Петербург 3 декабря 2020 года

Под редакцией А. В. Силина, Л. Б. Гайковой

Часть 2

Санкт-Петербург 2020 УДК 54+57+61 ББК 24.28.5 С56

Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 3 декабря 2020 года / Под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой. Ч. 2. — СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2020. — 312 с.

ISBN 978-5-89588-119-4 4. 2. 978-5-89588-121-7

Редакционная коллегия: д.м.н., доц., зав. кафедрой биологической и общей химии им. В.В. Соколовского *Гайковая Л.Б*, д.х.н., проф. *Дадали В.А.*, к.п.н., доц. *Иванова И.С.*, к.х.н., доц. *Попов А.С.*, к.х.н., доц. *Чухно А.С.*, к.б.н. *Власова Ю.А*.

Сборник научных трудов предназначен для сотрудников образовательных организаций высшего и дополнительного профессионального медицинского образования, врачей клинической лабораторной диагностики и других специальностей, сотрудников научно-исследовательских институтов и лабораторий, обучающихся медицинских вузов по программам специалитета, магистратуры, ординатуры, аспирантуры, сотрудников органов и учреждений, подведомственных Минздраву России и Роспотребнадзору, должностных лиц органов исполнительной власти, курирующих вопросы укрепления общественного здоровья и оказания медицинской помощи населению и других заинтересованных лиц.

Материалы публикуются в авторской редакции.

ISBN 978-5-89588-119-4 4. 2. 978-5-89588-121-7

Проблемное поле конференции:

- актуальные вопросы физической, коллоидной, аналитической, органической и неорганической химии природных и биологически активных соединений, а также применение химии в медицинской практике;
- актуальные вопросы биологической и медицинской химии;
- современные достижения в клинической лабораторной диагностике;
- проблемы теории и практики химико-биологического образования в медицинском вузе.

© Издательство СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ8
Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Ерохина П.Д. Оценка окислительного стресса при экзогенном воздействии пероксида водорода <i>in vitro</i>
Андреева Е.А., Довбыш О.В., Дубровский Я.А., Филатенкова Т.А., Комлев А.С., Кудрявцев И.В., Янкелевич И.А., Шамова О.В. Исследование интернализации флуоресцентно-меченных антимикробных пептидов в опухолевые клетки K-562 in vitro14
Астратенкова И.В., Голованова Н.Э., Селина Е.Н. Актуальность исследования полиморфизма генов ферментов антиоксидантной системы для оценки предрасположенности человека к мультифакторным заболеваниям
Бердичевский Г.М., Васина Л.В., Галкин М.А. Изучение влияния детонационных наноалмазов на мембрану митохондрий
Бландов А.Н., Шлейкин А.Г., Кружляк Петер (Kruzliak Peter), Муста Оглы Н.М. Источники канцерогенов и механизмы возникновения рака28
Великанова Л.И., Шафигуллина З.Р., Ворохобина Н.В., Малеваная Е.В. Основные варианты стероидных профилей мочи при адренокортикальном раке на основе метода газовой хроматомасс-спектрометрии
Власова Ю.А. Защитный и антиоксидантный эффект ганглиозидов41
Вольхина И.В., Наумова Н.Г. Изменения показателей обмена биополимеров соединительной ткани при иммобилизации в тонкой кишке крыс
Воронина П.А., Шмурак В.И., Баталова А.А., Белинская Д.А., Гончаров Н.В. Влияние внутримолекулярных дисульфидных связей на ферментативную активность бычьего сывороточного альбумина
в эксперименте <i>in vitro</i>
Жукова О.Ю., Богданчикова П.В., Цвяк М.А., Конышева А.А. Влияние состава среды выделения при получении гомогенатов тканей животных на активность супероксиддисмутазы и каталазы67

Заерко А.В., Федина Е.М., Зиматкин С.М., Валько Н.А. Иммунореактивность NeuN, нейроглобина и АТФ-синтазы в развивающихся гистаминергических нейронах гипоталамуса крысы
Захаров А.С., Матвеева И.В., Короткова Н.В. Роль катепсинов в клеточной смерти и канцерогенезе
Киндоп В.К., Беспалов А.В., Доценко В.В. Синтез и свойства соединений на основе 2-хлор-N-(3,4-диарилтиазол-2(3H)-илиден) ацетамидов
Кириллова Н.В., Спасенкова О.М., Ли А.О. Влияние малобена на содержание общих липидов и гликогена в печени и мышцах при экспериментальном стеатозе печени91
Кличханов Н.К., Джафарова А.М., Аль-Рабии М.А.М., Газимагомедова М.М.
Липидный состав плазмы крови крыс при умеренной гипотермии94 Крысько М.В., Стрелова О.Ю., Головина А.Е., Шаландаева М.С. Трудности интерпретации результатов химико-токсикологического анализа при обнаружении лекарственных веществ с особенностями метаболизма (фенибут, селегилин, мебеверин)
Лукашевич В.С., Новаковская С.А., Пыж А.Э., Рудниченко Ю.А., Хрусталёва Т.А. Структурно-функциональный анализ состояния организма экспериментальных животных под влиянием длительного приема алкоголя
Магомедова М.А., Абдулнатипов А.И., Газимагомедова М.М. Изменение уровня некоторых метаболитов углеводно-липидного метаболизма у подростков Дагестана в зависимости от природно-климатических условий
Манасян А.Л., Апрятин С.А., Муртазина Р.З., Клименко В.М. Поведенческие особенности самок крыс нокаутной линии TAAR9-KO
Миронова К.А., Бакурова Е.М. Нарушение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках крови у пациентов с онкопатологией
Мирошникова Е.Б., Дадали Ю.В., Дадали В.А., Галебская Л.В. К вопросу о влиянии некоторых соединений фенольной природы на стабильность биомембран в модели фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов: І. Сравнение эффектов коэнзима Q_{10} и мексидола
Мухамеджанов Э.К., Лю М.Б. Биохимические основы развития метаболического синдрома 140

Мухамеожанов Э.К., Аитынова А.Е., Ерожанова С.С. Роль биохимии в развитии науки о питании144
Мухаммадиева Г.Ф., Хуснутдинова Н.Ю., Валова Я.В., Зиатдинова М.М., Репина Э.Ф., Каримов Д.О., Якупова Т.Г. Изменение профиля экспрессии гена Sod1 при индуцированном токсическом гепатите
Плехова Н.Г., Степанюгина А.К., Коршунова О.В., Черненко И.Н., Шевченко О.В., Апанасевич В.И. Фотосенсибилизатор хлорофиллин как перспективное лечебное
средство для фотодинамической терапии при онкологии
Побойнев В.В., Акуневич А.А., Хрусталёв В.В., Хрусталёва Т.А., Арутюнян А.М., Кордюкова Л.В.
Аминокислотная замена D46G увеличивает бета-структурный потенциал эпидермального фактора роста человека
Попова О.В., Пайгачкина А.С. Влияние бетулина и бетулоновой кислоты на некоторые характеристики мембран эритроцитов
Постникова Л.А., Нониашвили Е.М., Паткин Е.Л. Действие лактоферрина на развитие ранних зародышей мышей, при внутриутробном воздействии бисфенола А
Рута-Жуковская Е.Я., Сяхович В.Э., Бабарико Д.В., Бакакина Ю.С., Беляев С.А., Прадун С.А.
Определение в крови человека кровезаменителей на основе интактных и модифицированных гемоглобинов различного происхождения с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии
Сальникова О.П., Фатьянова А.В., Яровая О.И., Салахутдинов Н.Ф. Влияние нового противовирусного агента камфецина
на морфофункциональные корреляты углеводного обмена
Самохина Л.М., Крахмалова Е.О., Антонова И.В. Возрастные аспекты изменений общей антиоксидантной активности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и ишемической болезнью сердца с учетом
частоты обострений ХОБЛ
Самохина Л.М., Топчий И.И., Кириенко А.Н. Фосфор и кальций на фоне прогрессирования диабетической нефропатии, сочетанной с артериальной гипертензией
Старцева О.М., Пылина Я.И., Расова Е.Е., Белых Д.В.
Синтез и цитотоксическая активность металлокомплексов с фрагментом диэтиленгликоля

Степочкина А.М., Бахтюков А.А., Деркач К.В., Голованова Н.Э., Шпаков А.О.
Сравнительное изучение стимулирующего эффекта хорионического гонадотропина на тестикулярный стероидогенез
у диабетических и стареющих крыс
Хакимова Р.А., Бекташев И.Б., Дилшодов А.Д. Применение мумиё-асиль в терапии хронического туберкулеза легких
Хотько Е.А., Харлап А.Ю.
Ассоциация полиморфизмов генов IL10, IL4 и IL4R с предрасположенностью к хронической обструктивной болезни легких в белорусской популяции
Хрусталёв В.В., Хрусталёва Т.А., Арутюнян А.М., Кордюкова Л.В., Побойнев В.В.
Олигомеры аттенуированного прионного пептида CC36 диссоциируют при нагревании: спектроскопическое исследование
Шлейкин А.Г., Бландов А.Н., Кружляк Петер (Kruzliak Peter), Муста Оглы Н.М.
Биологически активные вещества растений как потенциальные антагонисты канцерогенов и их роль в химиопрофилактике рака 230
ПРОБЛЕМЫ ТЕОРИИ И ПРАКТИКИ ХИМИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНСКОМ ВУЗЕ237
<i>Бейшебаева Ч.Р.</i> Метод «ассистирования» в преподавании биохимии
Ватутина И.В., Зотова Е.Е., Пономарева Н.И. Самостоятельная работа при изучении биологически активных
добавок к пище
Витязева О.В., Наумова Л.А. Применение комплексной самостоятельной работы в химико-биологическом образовании студентов
Гавронская Ю.Ю., Середович А.С. Интернет-мемы в технологии эдьютеймента обучения химии252
Гайковая Л.Б., Антонова Ж.В., Павлова Р.Н., Соколова М.Н., Голованова Н.Э.
Методические аспекты преподавания учебной дисциплины «Биологическая химия — биохимия полости рта» студентам
«Виологическая химия — опохимия полости рта» студентам начальных курсов стоматологического факультета
медицинского университета

Иванова И.С., Попов А.С., Гайковая Л.Б., Власова Ю.А. Изучение мотивации к обучению в медицинском вузе
по анкетированию студентов первого курса медико-
профилактического факультета
Ильинова Т.Н., Пономарева Н.И.
Проблемы теории и практики химического образования в медицинском вузе
Козлова-Козыревская А.Л. Формирование научного мировоззрения студентов при изучении химии
Козлова-Козыревская А.Л., Васильева Н.Г.
Самостоятельная работа по химии на этапе обобщения знаний271
Литвинова Т.Н., Литвинова М.Г.
Эволюция химического образования в системе медицинского 275
Лямин А.Н.
Демонстрационный эксперимент на лекционных занятиях
по химии в медицинском университете
Магомедова М.А., Арбуханова М.С., Газимагомедова М.М.
Проблемы изучения биохимии в медицинском вузе и пути
их решения
Михайлова Н.В., Орлова И.А., Сямтомова О.В.
Особенности базовой подготовки студентов медицинского вуза
в процессе изучения дисциплины «Химия»
Спасенкова О.М., Кириллова Н.В., Ли А.О.
Особенности преподавания химико-биологических дисциплин на кафедре биохимии СПХФУ295
Терских А.П., Алехина М.И.
Использование заданий с повышающимся уровнем сложности
при проведении контрольных занятий по фармацевтической химии 298
Тучик Е.С., Иваненко Т.А., Шведов С.Н.
Особенности образования с помощью дистанционного метода 302
Яроватая М.А., Таканаев А.А., Юшкова Е.И.
Особенности реализации образовательной программы
по биохимии в медицинском вузе в условиях дистанционного
обучения

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ

УДК 57.042

Абаленихина Ю.В.¹, Щулькин А.В.², Ерохина П.Д.³ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань abalenihina88@mail.ru¹, alekseyshulkin@rambler.ru², hippopotamus-cat-19@yandex.ru³

Оценка окислительного стресса при экзогенном воздействии пероксида водорода in vitro

Воздействие пероксида в концентрации 5-50 мкМ приводит к развитию окислительного стресса, характеризующегося увеличением окисленных белков и липидов, снижением уровня небелковых SH-групп, снижением трансэпителиального сопротивления клеток и жизнеспособности.

Ключевые слова: окислительный стресс, Caco-2, выживаемость, карбонильные производные белков, продукты перекисного окисления липидов.

Abalenikhina Yu.V., Shchulkin A.V., Erokhina P.D. Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Assessment of oxidative stress under exogenous exposure to hydrogen peroxide in vitro

The effect of peroxide at a concentration of 5-50 μ M leads to oxidative stress, characterized by increased oxidized proteins and lipids, the decrease in nonprotein SH-groups, reduced transepithelial resistance of cells and viability.

Key words: oxidative stress, Caco-2, survival, carbonyl derivatives of proteins, products of lipid peroxidation.

Клеточная линия Сасо-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека) представляет собой клетки, которые при длительном культивировании способны спонтанно дифференцироваться в эпителиальную структуру, обладающую свойствами кишечного эпителия [1]. Именно поэтому данная клеточная линия широко используется для изучения абсорбции ксенобиотиков в кишечнике. Формирование эпителиоподобной структуры во многом зависит от дифференциальной активности клеток и жизнеспособности, а также от окружающих условий. Экзогенные соединения при взаимодействии

с переходными металлами могут образовывать свободные радикалы, которые имеют регуляторное значение при низких или умеренных концентрациях [2]. Избыток свободных радикалов и окислителей иницирует развитие окислительного стресса, что приводит к повреждению клеточных мембран, белков, липидов, липопротеинов и нуклеиновых кислот. Известно, что окислительный стресс является результатом дисбаланса между образованием и обезвреживанием свободных радикалов [3].

В связи с этим актуальным представляется изучить экзогенное влияние пероксида водорода на окисление липидов и белков в сочетании с оценкой антиоксидантной защиты *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены in vitro на линии клеток Сасо-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека), полученной из ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург. Клетки культивировали при 37°С и 5% содержании СО2 в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащей L-глутамин (4 мМ), 15% бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина в 96-луночном планшете — для оценки цитотоксичности пероксида водорода; в 6-луночном планшете — для оценки влияния пероксида водорода на уровень продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков, небелковых SH-групп; в специальных трансвелл-системах — для оценки трансэпителиального сопротивления клеток.

Клетки инкубировали в питательной среде, содержащей H2O2 в концентрации 0,1; 0,5; 1; 5; 10 и 50 мкМ в течение 24 часов. На каждый эксперимент было по 3 повторения. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА с последующим лизированием. Клетки промывали изотоническим раствором натрия хлорида, добавляли 450 мкл лизирующего буфера, содержащего 0,5% тритона X-100 и ингибитор протеиназ, встряхивали на шейкере и инкубировали на льду, затем центрифугировали 10 минут при 5000 g. Цитоплазматическую (экстраядерную) использовали для дальнейшего анализа [4].

С помощью коммерческих наборов проводили оценку концентрации продуктов ПОЛ («Elabscience», Китай) и карбонильных производных белков («Sigma-Aldrich», Германия). Анализ выполняли на спектрофотометре для планшетов StatFax 2100 («AwarenessTechnology», США).

Анализ содержания SH-групп в лизате клеток проводили по методу Эллмана с 5,5'-дитиобис(2-нитро)бензоатомом (DTNB) [5].

Для определения содержания небелковых SH-групп пробу предварительно смешивали с охлажденной 5% трихлоруксусной кислотой. Содержание SH-групп определяли по оптической плотности при 412 нм на спектрофотометре для планшетов StatFax 2100 («AwarenessTechnology», США).

Концентрацию белка в пробах анализировали методом Бредфорда. Для выявления цитотоксичных концентраций пероксида водорода использовали скрининговый метод оценки выживаемости клеток МТТ-тест [6]. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле (ОП — оптическая плотность):

(ОП опытных лунок — ОП среды)/(ОП контр. лунок — ОП среды)×100%

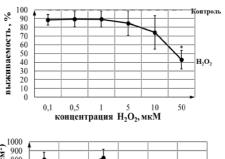
Целостность эпителиального барьера оценивали путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) с использованием вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США) и выражали в MOm^*cm^2 [7].

Полученные результаты анализировали с помощью программы «Stat Soft Statistica 13.0». Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при p<0,05.

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты показывают, что тенденция к снижению выживаемости клеток Caco-2 отмечалась с концентрации пероксида водорода 5 мкМ, и статистически значимо уменьшалась при концентрации 50 мкМ (рис. 1). Трасэпителиальное сопротивление монослоя клеток статистически значимо снижалось после инкубации с пероксидом водорода в концентрациях 5; 10 и 50 мкМ (рис. 1), что свидетельствует о нарушении межклеточных контактов.

При экзогенном воздействии пероксида водорода в концентрации 50 мкМ увеличивается содержание продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида, 4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя), в концентрациях 5-50 мкМ наблюдается увеличение уровня карбонильных производных белков (табл. 1).

Воздействие H_2O_2 в течение 24 часов в концентрациях 0,1; 0,5 и 1 мкМ приводило к увеличению небелковых SH-групп (табл. 1) относительно значений контрольной группы. При концентрации H_2O_2 5; 10 и 50 мкМ уровень восстановленных небелковых (табл. 1) тиолов снижался относительно контрольных значений, что свидетельствует об усугублении окислительного стресса.



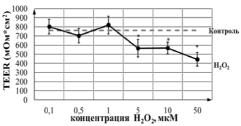


Рис. 1. Изменение выживаемости (слева) и трансэпителиального сопротивления (справа) клеток Сасо-2 при инкубации с пероксидом водорода 24 ч в концентрациях 0,1—50 мкМ.

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы контроль (p<0,05).

Таблица 1. Концентрация продуктов перекисного окисления липидов, карбонильных производных белков и небелковых SH-групп в лизате клеток Caco-2 ($M\pm SD$)

Концентрация	Карбонильные производные, нмоль/мг белка	Продукты пере- кисного окисления липидов, мкмоль/мг белка	Небелковые SH-группы, мкмоль/мг белка
Контроль	0,27±0,08	1,99±0,2	0,009±0,001
H ₂ O ₂ 0,1 мкМ	0,24±0,08	1,39±0,19	0,012±0,002*
H ₂ O ₂ 0,5 мкМ	0,35±0,06	1,71±0,15	0,013±0,004*
H ₂ O ₂ 1 мкМ	0,32±0,02	1,54±0,15	0,014±0,001*
H ₂ O ₂ 5 мкМ	0,53±0,05*	2,09±0,21	0,006±0,003*
${ m H_2O_210}$ мкМ	0,64±0,06*	2,08±0,15	0,003±0,001*
H ₂ O ₂ 50 мкМ	0,74±0,08*	2,51±0,16*	0,002±0,0002*

^{*} Статистически значимые отличия от контроля (р<0,05).

К воздействию активных форм кислорода (АФК) чувствительны белковые молекулы и липиды. Окисление белков представляет собой процесс их ковалентной модификации, вызванный непосредственным воздействием АФК непосредственно с аминокислотными остатками или побочными продуктами окислительного стресса [8]. Малоновый диальдегид и 4-гидрокси-олефины являются наиболее распространенными продуктами взаимодействия липидов с АФК. Важно, отметить, что малоновый диальдегид в своей структуре имеет две альдегидные группы, что способствует его взаимодействию с аминогруппами белков, 4-гидрокси-2-ноненаль может взаимодействовать с гистидином, лизином и цистеином, образуя циклические продукты, способные далее превращаться в карбонильные группы [9]. Возможно, по этому механизму происходит увеличение уровня карбонильных производных белков и не изменяется концентрация продуктов перекисного окисления липидов при концентрациях экзогенного пероксида водорода 5-10 мкМ.

Белки и липиды являются структурными компонентами мембран, поэтому их повреждение приводит к снижению трансэпителиального сопротивления клеток при концентрациях $\rm H_2O_2$ 5; 10 и 50 мкМ, что сопровождается нарушением клеточного монослоя и повреждением мембран.

Среди аминокислотных остатков наиболее чувствительным к окислению является цистеин, который входит в состав небелковых сульфгидрилов (небелковые тиолы). Небелковые тиолы в основном представлены глутатионом [10]. Поэтому в представленной работе для характеристики степени антиоксидантной защиты использовали оценку небелковых SH-групп в лизате клеток линии Caco-2.

При концентрациях пероксида водорода 0,1-1 мкМ уровень восстановленных небелковых тиолов возрастает, что указывает на формирование антиоксидантной защиты. Увеличение концентрации H_2O_2 , сопровождается снижением концентрации небелковых SH-групп, что может объясняться не только усугублением окислительного стресса, но и снижением жизнеспособности клеток.

Таким образом, экзогенное воздействие пероксида водорода в концентрациях 0,1-1 мкМ на клетки линии Caco-2 приводит к активации антиоксидантной защиты, а в концентрациях 5-50 мкМ — развитию окислительного стресса, характеризующегося снижением жизнеспособности клеток, трансэпителиального сопротивления и увеличением продуктов перекисного окисления липидов и белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук МК-1856.2020.7.

Список литературы

- 1. Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stammati A., Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. // Cell Biol. Toxicol. 2005. Vol. 21, No. 1. P. 1-26.DOI: 10.1007/s10565-005-0085-6.
- 2. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative stress. // Redox. Biol. 2017. Vol. 11. P. 613—619. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.035
- 3. Ершов А.Ю., Копаница М.А., Короткова Н.В., Кулешова Л.Ю., Фомина М.А. Антиоксидантная активность гликонаночастиц серебра на основе меркаптопропионилгидразонов моно- и дисахаридов // Наука молодых (Eruditio Juvenium). -2019. Т. 7, №2. С. 247-254. doi:10.23888/HMJ201972247-254.
- 4. Tinnikov A.A., Samuels H.H. (2013) A novel cell lysis approach reveals that caspase-2 rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm in response to apoptotic stimuli. // PLoS ONE. Vol. 8(4), e61085, DOI: 10.1371/journal.pone.0061085.
- 5. Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S. et al. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia Coli // J. Biol. Chem. -2000 Vol. 275(46). P. 35908-35913.
- 6. Tolosa, L., Donato, M.T., Gómez-Lechón, M. J. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. // Methods Mol. Biol.-2015- Vol. 1250. P- 333-348, DOI: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
- 7. Ferraretto A., Bottani M., De Luca P., Cornaghi L., Arnaboldi F., Maggioni M., Fiorilli A., Donetti E. Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an in vitro model of human intestinal epithelium. Biosci Rep. 2018, Vol. 38, No.2. BSR20171497. DOI: 10.1042/BSR20171497.
- 8. Isabella Dalle-Donnea Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // Clinica Chimica Acta. 2003.- Vol.329.- P.23–38.
- 9. Лущак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма // Биохимия. 2007.- Т. 72, 8.- С. 995-1017.

10. Nagy L., Nagata M., Szabo S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrotoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents // World J. Gastroenterol. – 2007; 13(14): 2053-2060.

УДК 577

Андреева Е.А.^{1,2}, Довбыш О.В.³, Дубровский Я.А.^{2,4}, Филатенкова Т.А.¹, Комлев А.С.¹, Кудрявцев И.В.¹, Янкелевич И.А.^{1,2}, Шамова О.В.¹

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»¹

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»²

Минздрава России

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»³

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» 4

Санкт-Петербург jkaypopey@gmail.com

Исследование интернализации флуоресцентно-меченных антимикробных пептидов в опухолевые клетки K-562 in vitro

Получены конъюгаты синтетических аналогов пролин-богатых антимикробных пептидов семейства бактеницинов с флуоресцентным красителем (BODIPY FL). С помощью проточной цитометрии показано, что эффективность проникновения меченых пептидов в клетки-мишени опухолевой клеточной линии K-562 зависит от концентрации пептидов и времени их воздействия на клетки.

Ключевые слова: интернализация в клетки, антимикробные пептиды, иитотоксическое действие, бактеницины, BODIPY FL.

Andreeva E.A.^{1,2}, Dovbysh O.V.³,
Dubrovsky Y.A.^{2,4}, Filatenkova T.A.¹,
Komlev A.S.¹, Kudryavtsev I.V.¹,
Yankelevich I.A.^{1,2}, Shamova O.V.¹
Federal State Budgetary Scientific Institution
«Institute of Experimental Medicine»¹
Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University²
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University³
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
«Saint-Petersburg State University»⁴
St. Petersburg

Study of internalization of antimicrobial peptides labelled with a fluorophore into K-562 cancer cells in vitro

We have conjugated a set of synthetic analogs of proline-rich antimicrobial peptides bactenecin family with a fluorescent dye (BODIPY FL) have been obtained. Using flow cytometry, it was shown that the efficacy of the labeled peptides to penetrate into target cells of the K-562 tumor cell line depends on the concentration of peptides and the time of their effect on cells.

Key words: internalization, antimicrobial peptides, cytotoxicity, bactenecin, BODIPY FL.

Изучение способности антимикробных пептидов системы врожденного иммунитета млекопитающих к интернализации в опухолевые и нормальные клетки является одним из актуальных направлений биомедицинских исследований, результаты которых могут послужить основой для разработки потенциальных средств противоопухолевой таргетной терапии или векторов целенаправленной доставки лекарственных препаратов в клетки-мишени.

Среди многочисленных способов доставки лекарственных препаратов в клетку наиболее часто используются вирусные векторы, микроинъекция, электропорация, инкапсуляция в липосомы. Однако данные методы обладают рядом недостатков, среди которых невысокая эффективность доставки лекарств, механическое повреждение клетки, токсичность в отношении нормальных клеток, лимитированное применение *in vivo*, а также ограничения, связанные с физикохимическими и фармакологическими свойствами доставляемых лекарств.

В связи с этим, особый интерес представляют природные антимикробные пептиды, способные проникать во внутриклеточные компартменты, не нарушая целостности мембран и не вызывая гибе-

ли клеток. Кроме того, это свойство проникающих через мембраны пептидов представляет несомненный фундаментальный интерес, так как дает возможность предположить участие этих молекул в различных внутриклеточных процессах [1].

Широко распространенным и эффективным методом изучения процесса интернализации является внесение в состав пептидной молекулы флуоресцентной метки, которая позволяет детектировать наличие целевого пептида во внутриклеточном пространстве с помощью таких методов, как проточная цитометрия и флуоресцентная микроскопия [2].

Целью настоящей работы является оценка способности к интернализации структурных аналогов пролин-богатых антимикробных пептидов семейства бактеницинов, а именно, бактенецинов домашней козы *Capra hirca*, несущих флуоресцентную метку, в опухолевые клетки линии эритромиелоидной лейкемии человека K-562 методом проточной цитометрии.

Объектами исследования являются химически синтезированные пептиды ChBac3.4-C, ChBac3.4(12-26)-C, miniChBac7.5 α -C и ChBac5(7-22). В качестве флуоресцентной метки для мечения пептидов выбран флуорофор BODIPY FL (Thermo Fisher Scientific, США).

Конъюгацию пептидов ChBac3.4-C, Bac3.4(12-26)-С и miniBac7.5a-С с BODIPY FL maleimide осуществляли в 0,01 М фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7.3-7.5, в течение 4 часов, при комнатной температуре и постоянном перемешивании. В данных условиях метка ковалентно связывается с судьфгидрильными группами аминокислотных остатков цистеина.

Конъюгацию пептида Bac5(7-22) с BODIPY FL SE (D6140, Molecular Probes, USA) осуществляли в 0,05М натрий-фосфатном буферном растворе, рН 6.5, в течение 24 часов, при комнатной температуре и постоянном перемешивании. В данных условиях присоединение метки ведется по N-концевой аминокислоте. Молярное соотношение флуорофора к пептиду в реакционной смеси составило 7:1. Реакцию останавливали, добавляя трифторуксусную кислоту до конечной концентрации 0,1%.

Далее осуществляли хроматографическую очистку конъюгатов от непрореагировавших пептидов и других нежелательных продуктов реакции методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на установке Gold System (Beckman Coulter, США), на колонке Vydac C18 ($10 \times 250 \text{ мм}$, 5Å), с использованием линейного градиента ацетонитрила с 0.1% трифторуксусной кислотой — от 10% до 60% за 60 минут.

Для очищенных конъюгатов была проведена идентификация и оценка степени чистоты методами электроспрей масс-спектрометрии и нативного электрофореза в кислой буферной системе, в присутствии мочевины в 12,5% полиакриламидном геле. Концентрацию меченых пептидов определяли спектрофотометрически с учетом коэффициента молярной экстинкции BODIPY FL.

Количественная оценка интернализации меченных пептидов в опухолевые клетки-мишени линии К-562 была проведена методом проточной цитометрии на приборе Navios (Beckman Coulter, США) по увеличению величины сигнала зеленой флуоресценции. Для этого суспензии клеток (300 000 клеток в 50 мкл бессывороточной среды RPMI-1640) инкубировали при 37° с меченными пептидами в различных условиях. В одной серии экспериментов пептиды в разных концентрациях (0,1 мкM, 0,2 мкM, 0,5 мкM, 1,0 мкM, 2,0 мкМ и 5,0 мкМ) инкубировали с клетками в течение 30 минут; в другой серии — клетки обрабатывали пептидами, взятыми в одной концентрации (0,2 мкМ), но в течение разных промежутков времени -0, 15, 30 и 60 минут. По завершении времени инкубации клетки отмывали от не связавшихся меченых пептидов забуференным физиологическим раствором (рН 7.3-7.5). За 3 минуты до исследования к отмытым клеткам добавляли 0,4% раствор трипанового синего (Merck, США) до его конечной концентрации 40 мкг/мл для элиминирования сигнала флуоресценции от меченых пептидов, находящихся на поверхности клеток-мишеней. Для оценки возможного цитотоксического действия исследуемых меченых пептидов учитывали долю погибших клеток с помощью флуоресцентного красителя DAPI.

В результате работы получены индивидуальные фракции пептидов ChBac3.4-C, ChBac3.4(12-26)-C, miniChBac7.5α-C и ChBac5(7-22), меченых флуоресцентной меткой BODIPY FL, для которых показана электрофоретическая подвижность по направлению к катоду в кислой среде, отличная от подвижности исходных пептидов. Масс-спектрометрический анализ подтвердил чистоту конъюгатов, а также показал соответствие экспериментальных и расчетных значений их молекулярных масс.

Количественная оценка способности к интернализации полученных меченых пептидов в опухолевые клетки линии K-562 методом проточной цитометрии показала, что с повышением концентрации пептидов и продолжительности инкубирования, средняя интенсивность флуоресценции воспроизводимо возрастала и на несколько порядков превышала уровень аутофлуоресценции. При этом доля погибших клеток не отличалась от таковой в контрольных пробах (без добавления пептидов). Поскольку раствор трипанового синего, кото-

рый не проникает в цитоплазму живых клеток, элиминировал флуоресцентный сигнал BODIPY FL на поверхности клеток-мишеней, то было сделано заключение о том, что меченые пептиды ChBac3.4-C, ChBac3.4(12-26)-C, miniChBac7.5 α -C и ChBac5(7-22) в концентрациях от 0,1-0,2 мкМ и выше активно проникают в клетки-мишени в течение 15 минут, не вызывая при этом их гибели.

Таким образом, процесс интернализации данных меченых пептидов в опухолевые клетки линии К-562 является концентрационно-зависимым.

В целом, полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о возможности использования исследуемых пептидов для доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки, а также позволяют отобрать наиболее перспективные структуры для дальнейших исследований.

В последующих экспериментах будет проведена конъюгация пептидов с противоопухолевыми агентами, в частности доксорубицином, и проанализирована их способность облегчать перенос этого препарата в малигнизированные клетки человека in vitro, а также повышать выживаемость животных при использовании конъюгатов на моделях опухолевого роста.

Список литературы

- 1. Шамова О.В. и др. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре // Цитология. -2007. -№12. -C. 1000-1010.
- 2. Kauffman W. B. et al. Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides // Trends in Biochemical Sciences. 2015. V.40. P. 749-764.

УДК 575.17:616-036

Астратенкова И.В. 1 , Голованова Н.Э. 1,2 , Селина Е.Н. 1,3 СПбГУ 1 , ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова 2 , ФГБНУ «ИЭМ» 3 Санкт-Петербург, Россия astratenkova@mail.ru, nesh 1764@mail.ru, selina.elena@mail.ru

Актуальность исследования полиморфизма генов ферментов антиоксидантной системы для оценки предрасположенности человека к мультифакторным заболеваниям

Аннотация: в статье обсуждается актуальность исследования полиморфизма генов ферментов антиоксидантной системы—супероксиддисмутазы SOD2 (C47T, rs4880) и каталазы CAT

(-262C/T, rs 1001179) в связи с развитием мультифакторных заболеваний, сопряженных с сигнальным путем NF-kB, в частности артериальной гипертензией.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, антиоксидантная система, каталаза, супероксиддисмутаза, ангиотензиноген, артериальная гипертензия

Astratenkova I.V.¹, Golovanova N.E.^{1,2}, Selina E.N.^{1,3} SPbSU¹, N-WSMU named after I.I. Mechnikov ², FSBSI «IEM»³ St. Petersburg, Russia

The relevance of the study of genetic polymorphism of enzymes of the antioxidant system for assessing a person's predisposition to multifactorial diseases

Summary: The article discusses the relevance of studying the polymorphism of genes of antioxidant system enzymes — superoxide dismutase SOD2 (C47T, rs4880) and catalase CAT (-262C / T, rs1001179) in connection with the development of multifactorial diseases associated with the NF-kB signaling pathway, in particular, arterial hypertension.

Key words: genetic polymorphism, antioxidant system, catalase, superoxide dismutase, angiotensinogen, arterial hypertension

Введение. Хорошо известна связь мультифакторных заболеваний с развитием и активацией окислительного стресса, который может быть вызван снижением эффективности антиоксидантной защиты организма. Исследования последних лет продемонстрировали общий механизм активации провоспалительных генов через сигнальный путь NF-kB, одним из основных активаторов которого является перекись водорода. NF-kB — сигнальный путь является одним из ключевых пунктов внутриклеточной сигнализации, ответственных за развитие артериальной гипертензии, атеросклероза, инсулинорезистентности, СД 2 типа и некоторых других [1, 2, 3]. В настоящее время оценка предрасположенности к этим заболеваниям проводится на основе полиморфизма генов—маркеров соответствующих патологических процессов. В то же время знание полиморфизма генов ферментов антиоксидантной системы (АОС) может быть полезным для предсказания тяжести заболевания (рис. 1).

Наиболее подробно изучен NF-kB путь активации гена ангиотензиногена и развитие артериальной гипертензии. Показано, что ангиотензин II (ATII) активирует НАД Φ H-оксидазу в кровеносных со-

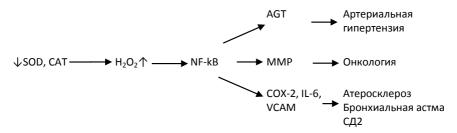


Рис. 1. Взаимосвязь окислительного стресса и мультифакторных заболеваний

судах, почках, мозге и таким образом увеличивает образование супероксиданионрадикала и гидроперекиси [4]. В связи с этим нами было проведено исследование, целью которого явилось выявление частоты встречаемости полиморфных вариантов гена-маркера артериальной гипертензии (AGT) в сочетании с SOD2 и CAT.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 65 человек (18—22 лет), на данный момент не имеющих патологии со стороны сердечно-сосудистой системы. Для взятия эпителиальных клеток ротовой полости и выделения геномной ДНК использовали коммерческие наборы «ДНК-сорб-А» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва).

Оценку полиморфных вариантов генов проводили с использованием наборов реагентов для $\Pi \coprod P$ в реальном времени фирмы «Синтол» (Москва) на приборе «Dtlite — $\coprod HK$ -технология».

В группе обследованных определяли полиморфизм гена AGT (C521T, rs4762), кодирующего белок ангиотензиноген. Затем у носителей аллеля Т AGT определяли полиморфизмы генов CAT (-262C/T, rs1001179), кодирующего каталазу и SOD2 (C47T, rs4880), кодирующего митохондриальную супероксиддисмутазу.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования частоты встречаемости полиморфизма C521T гена AGT в группе испытуемых распределились следующим образом: CC-53 человека, CT-8 человек, TT-4 человека. Частота встречаемости аллелей: C-87,7%, T-12.3%.

Распределение генотипов генов CAT (-262C/T) и SOD2 (C47T) среди полиморфных вариантов гена AGT (C521T) представлено на рис. 2.

В группе носителей гетерозиготного генотипа СТ AGT двое из обследованных имеют генотип СС CAT и шесть человек — СТ; также у двоих выявлен генотип СС SOD2 и у шестерых — СТ. В группе носителей гомозиготного генотипа ТТ AGT — один обследуемый имеет генотип СС CAT и три — СТ; также один имеет генотип СС SOD2 и три — СТ.

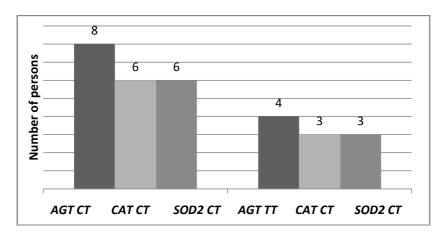


Рис. 2. Распределение генотипов CAT (-262C/T) и SOD2 (C47T) генов среди полиморфных вариантов AGT (C521T) гена

В исследуемом нами полиморфном варианте AGT в положении 521 происходит однонуклеотидная замена цитозина (C) на тимин (T). Результатом такой замены в белке ангиотензиногене в позиции 174 аминокислотной последовательности является замещение аминокислоты триптофан на метионин (Thr174Met). Присутствие в генотипе аллеля T существенно увеличивает риск развития гипертензии [5], поэтому генотип TT гена AGT представляется наиболее клинически значимым для оценки предрасположенности к сердечно-сосудистой патологии. Этот генотип связан с повышением концентрации ангиотензиногена, что приводит к увеличению содержания ATII и активации образования активных форм кислорода. При этом возрастает роль SOD2 и каталазы — ферментов AOC.

Изменчивость в структуре гена *SOD2* влияет на количество и активность синтезируемой в клетках митохондриальной Mn-зависимой супероксиддисмутазы. Полиморфизм C47T приводит к замене аминокислоты аланин на аминокислоту валин, изменяет вторичную структуру белка и может влиять на перенос фермента из цитоплазмы в матрикс митохондрий. Установлено, что у носителей аллеля T гена *SOD2* наблюдается уменьшение активности фермента SOD2 в митохондриях на 30-40% и возрастает риск развития сердечно-сосудистой патологии [6].

Полиморфизм -262C/T в гене CAT выражается в однонуклеотидной замене цитозина (C) на тимин (T) в промоторной области

в положении 262. Известно, что у носителей генотипа СС гена CAT наблюдается более высокая активность фермента каталазы, чем для генотипов СТ и ТТ, что способствует повышению антиоксидантного статуса клеток.

По результатам нашего исследования у 12 человек были выявлены генотипы AGT ассоциированные с гипертензией (рис. 2). Обследованный № 58 имеет генотипы SOD2 и CAT, соответствующие высокому уровню активности ферментов АОС, что может свидетельствовать о хорошей защите клеток при активации окислительных процессов под действием АТІІ. Обследованные №2,9,11,28,38 являются носителями гетерозиготных генотипов всех исследованных генов, поэтому для них можно предположить умеренный риск развития гипертонической болезни, обусловленной повышением концентрации ATII и понижением активности SOD2 и CAT. При сравнении полиморфизмов генов ферментов АОС, носители гетерозиготного варианта SOD2 и гомозиготного СС CAT находятся в более неблагоприятных условиях по сравнению с СС SOD2 и СТ CAT, так как SOD2 представляет собой первую линию защиты от окислительного стресса. Мы предполагаем, что риск развития АГ снижается у обследуемых в ряду №42 (AGT T/T, SOD2 C/T, CAT C/C), №61 (AGT T/T, SOD2 C/C, CATC/T), No 12 (AGTC/T, SOD2C/T, CATC/C), No 67 (AGTC/T, SOD2 C/C, CAT C/T). По нашему мнению, наибольший риск развития гипертензии имеется у двух обследованных, являющихся носителями 4 неблагоприятных аллелей исследованных генов (AGT T/T, SOD2 C/T, CAT C/T).

Заключение. Учитывая, что в современном мире наблюдается рост таких факторов, как эмоциональные нагрузки, загрязнение окружающей среды, нарушение питания и др., которые повышают опасность развития окислительного стресса в организме и параллельно сопряжены с развитием мультифакторных заболеваний, мы считаем целесообразным исследование полиморфизма генов АОС с целью оценки устойчивости организма к данным заболеваниям.

Список литературы

- 1. Song D., Fank G., Mao S-Z., Ye X., Liu G., Miller E. J, Greenberg H., Liu S.F. Selective inhibition of endothelial NF- α B signaling attenuates chronic intermittent hypoxia-induced atherosclerosis in mice // Atherosclerosis. 2018. V.270. P.68-75.
- 2. Meyerovich K., Ortis F., Cardozo A. The non-canonical NF- κB pathway and its contribution to β -cell failure in diabetes // Journal of

Molecular Endocrinology. 2018. V.61. №2. URL https://jme.bioscientifica. com/view/journals/jme/61/2/JME-16-0183.xml (дата обращения 15.08.2020).

- 3. Kanigur G.S., Soydas T., Yenmis G. NF-xB as the mediator of metformin's effect on ageing and ageing-related diseases // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2019. №46. P.413-422.
- 4. Sousa T., Oliveira S., Afonso J., Morato M., Patinha D., Fraga S., Carvalho F., Albino-Teixeira A. Role of H2O2 in hypertension, reninangiotensin system activation and renal medullary disfunction caused by angiotensin II // British journal of Pharmocology. 2012. V.166. №8. P.2386–2401. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01957.x
- 5. Wei Gu, Jielin Liu, Qiuli Niu, Hao Wang, Yuqing Lou, Kuo Liu, Lijuan Wang, Zuoguang Wang, Jingmei Zhang, Shaojun Wen. A-6G and A-20C Polymorphisms in the Angiotensinogen Promoter and Hypertension Risk in Chinese: A Meta-Analysis // PLoS One. 2011. V.6. №12. doi:10.1371/journal.pone.0029489
- 6. Подольская А.А., Галявич А.С., Майкова Е.В., Кравцова О.А., Алимова Ф.К. Роль генов антиоксидантной системы в формировании клинических фенотипов ишемической болезни сердца // Казанский медицинский журнал. 2013. Т. 94. № 2. С.228-234.

УДК 61:577.1

Бердичевский Г.М.¹, Васина Л.В.², Галкин М.А.³

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург grishaberd@gmail.com¹, lubov.vasina@gmail.com², miat2002@mail.ru³

Изучение влияния детонационных наноалмазов на мембрану митохондрий

При изучении влияния детонационных алмазов z- на АТФазную активность F1F0 из E. coli установлено, что наноалмазы проявляют разобщающий эффект, способствуя рассеянию протонного градиента, а также ингибируют АТФазу. Полученные данные позволяют оценить степень влияния ДНА как носителя в системах доставки ЛВ на основе наноалмаза на биоэнергетику клетки.

Ключевые слова: детонационные наноалмазы, митохондрии, F1F0 ATФаза

Berdichevskiy G.M., Vasina L.V., Galkin M.A.

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg

Investigation of the effect of detonation nanodiamonds on the mitochondrial membrane

Effect of detonation nanodiamonds on the E. coli F1F0 ATPase was studied. It was found that nanodiamonds exhibit an uncoupling effect, partially dissipating the proton gradient, and also inhibit ATPase. The data obtained make it possible to assess the degree of influence of DND as a carrier in drug delivery systems based on nanodiamond on cellular bioenergetics.

Key words: detonation nanodiamonds, mitochondria, F1F0 ATPase.

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных материалов для адресной доставки лекарств являются детонационные наноалмазы (ДНА), обладающие высокой устойчивостью к химической и физической деградации, фотостабильностью, биосовместимостью и способностью проникать через клеточные мембраны [1].

Наличие различных функциональных групп на поверхности ДНА обеспечивает возможность присоединения биологических макромолекул, которые в свою очередь могут выполнять роль терапевтических агентов.

Применение ДНА в медицине обусловливает всестороннее и глубокое изучение его влияния на системы живого организма.

В литературе имеются данные по сравнению влияния ДНА на функции различных клеточных органелл, в т.ч. митохондрий, которые являются центральным звеном в энергетическом метаболизме клетки. Так, в работе [2] по изучению влияния особенностей химического состава поверхности модифицированных ДНА на мембранный потенциал изолированных митохондрий было установлено, что ДНА, в особенности гидрированные и хлорированные, приводили к снижению мембранного потенциала митохондрий только после добавления их в большом количестве (>1 мг/мл). Наименьшее влияние на мембранный потенциал митохондрий оказывали ДНА-СООН (карбоксилированный) и очищенный от металлических примесей исходный ДНА. Кроме того, карбоксилированные ДНА благодаря отрицательному поверхностному потенциалу обладают большей биосовместимостью, поскольку большинство белков и клеток крови также заряжены отрицательно.

Известно, что АТФ-синтазный комплекс F1F0 имеет ключевое значение в обеспечении клетки АТФ. Центральная роль этого ферментного комплекса в энергетическом обмене расширяет потенциальную возможность использования АТФ-синтазы в качестве мише-

ни терапевтического воздействия. Несмотря на то, что известно более 300 природных и синтетических молекул, способных связываться с F1F0 или ингибировать этот комплекс [3], сравнительное изучение их участия в регуляции энергетического обмена началось лишь недавно [4].

В настоящее время рассматриваются пути регуляции гидролитической активности F1F0 как одного из подходов к созданию нового класса лекарственных препаратов.

Целью данной работы явилось изучение влияния карбоксилированных ДНА z- на АТФазную активность F1F0 из E. coli.

Материалы и методы исследования. Детонационные наноалмазы для исследования были предоставлены коллегами из физико-технического института имени А. Ф. Иоффе Российской академии наук.

Работа выполнялась совместно с коллегами из Clarendon Laboratory, Department of Physics, Oxford Univerity.

Основные этапы эксперимента. *Получение липосом*. Липосомы получали из фосфатидилхолина (диолеил) (20 мг) в хлороформе. Хлороформ удаляли продуванием азотом, при этом формировался тонкий слой липида. Для удаления остатка хлороформа пробирку с липидом помещали в вакуум на 10 мин. Далее добавляли 0.5 мл буфера А (10 мМ трицин, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, рН 8.0) и оставляли на 30 мин при комнатной температуре, после чего интенсивно перемешивали в течение 20-40 сек. Для получения липосом полученную эмульсию фосфатидилхолина подвергали экструзии через поликарбонатный фильтр с порами диаметром 100 нм 21 раз.

Выделение рекомбинантной F1F0-ATФазы (His-Tag) из E. coli. Белок экспрессировали из плазмиды pVF2. Мембраны, полученные при обработке прессом Френча, солюбилизировали в экстракционном буфере (50 мМ трис-HCl, pH 7.5, 100 мМ KCl, 40 мМ аминокапроновая кислота, 15 мМ пара-аминобензамидин, 5 мМ MgCl₂, 0.8% фосфатидилхолин, 1.5% октилглюкозид, 0.5% дезоксихолат натрия, 0.5% холат натрия, 2.5% глицерол, и 30 мМ имидазол) в течение 90 мин при 4°С, затем центрифугировали в течение 30 мин при 400000 х g для отделения несолюбилизированного остатка. Супернатант наносили на колонку Ni-NTA, уравновешенную экстракционным буфером и элюцровали с тем же буфером, содержашим 180 мМ имидазола [5].

Встраивание F1F0 в липосомы. Смешивали 140 мкл белка с 300 мкл липосом, добавляли 160 мкл буфера A и 60 мкл 10% холата в буфере A — конечный объем 660 мкл, соотношение белок/липид = 1/30. Инкубировали 15 мин при 4° С при медленном перемешивании, затем наносили смесь на колонку с сефадексом G-50 (V = 3 мл), уравнове-

шенным буфером А. Мутные фракции элюата, содержашие протеолипосомы, объединяли [6, 7].

АТФ-зависимую генерацию протонного градиента на мембране протеолипосом оценивали по тушению флуоресценции АСМА (9-амино-6-хлоро-метоксиакридина) при 492 нм (длина волны возбуждения 419 нм). Реакцию начинали добавлением 250 мкМ АТР к 1.9 мл буфера А, содержашего протеолипосомы (6.8 мкг белка) и 1 мкМ АСМА. Генерацию протонного градиента прекращали добавкой 2 мкМ нигерицина. В пробу добавляли 100 мкл водной суспензии ДНА z-.

Измерение АТФазной активности с феноловым красным. Измеряли АТФазную активность по выделению "стехиометрического" протона при 557 нм. Реакцию начинали добавкой 10 мкл протеолипосом (2.7 мкг белка) к 2 мл среды, содержащей 10 мМ трицин, 100 мМ NaCl, pH 8.0, 2 мМ ATP, 1 мМ MgCl $_2$, 60 мкМ феноловый красный, 1 мкМ СССР. Шкалу по протону калибровали, добавляя 5 мкл 0.1 М HCl. В пробу вносили 100 мкл водной суспензии ДНА z-. Все измерения проводили при комнатной температуре.

Обсуждение результатов и выводы. Было установлено, что добавление 250 мкМ АТФ к 2 мл буфера (рН 8.0), содержашего липосомы с встроенным F1F0 (6.8 мкг белка), приводило к тушению флуоресценции АСМА (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine), что указывает на АТФ-зависимую генерацию протонного градиента на мембране протеолипосом. Последующее добавление ДНА z- (100 мкл 0.3% суспензии) приводило к значимому уменьшению тушения АСМА, что можно интерпретировать как уменьшение протонного градиента (рис. 1).

В следующем эксперименте изучали действие ДНА z- на АТФазную активность F1F0 из E. coli (2.7 мкг белка/ 2 мл), измеренную по выделению «стехиометрического» протона с рН индикатором феноловым красным (рис. 2). Как видно из представленных данных, ДНА z- оказывал ингибиторное действие на активность АТФазы.

Таким образом, при изучении влияния ДНА z- на АТФазную активность F1F0 из E. coli установлено, что:

- 1) ДНА z- проявляют разобщающий эффект, способствуя рассеянию протонного градиента,
 - 2) ДНА z- оказывают ингибирующий эффект на АТФазу.

Полученные данные позволяют оценить степень влияния ДНА как носителя в системах доставки ЛВ на основе наноалмаза на биоэнергетику клетки. Анализ полученных нами результатов позволит снизить токсичность систем доставки лекарственных веществ за счет выбора наиболее оптимальных стратегий синтеза модифицированных ДНА и иммобилизации на их поверхности ЛВ.

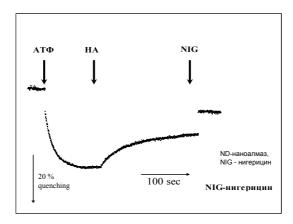


Рис. 1. Влияние ДНА z- на тушение флуоресценции АСМА

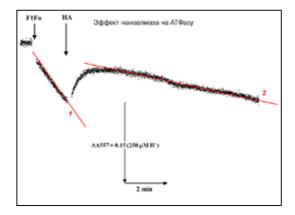


Рис. 2. Влияние ДНА z- на АТФазу

Список литературы

- 1. Яковлев Р.Ю., Кулакова И.И., Бадун Г.А., Лисичкин Г.В., Валуева А.В., Селезнев Н.Г., Леонидов Н.Б. Физико-химические принципы получения и свойства гибридных материалов на основе детонационных наноалмазов как систем доставки лекарственных веществ нового поколения // Разработка и регистрация лекарственных средств 2016; 3(16): 60-66.
- 2. Соломатин А.С., Яковлев Р.Ю., Федотчева Н.И., Леонидов Н.Б. Изучение влияния модифицированных наноалмазов на мембранный

потенциал изолированных митохондрий. // Материалы межрегиональной научной конференции с международным участием Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. — 2014;347-350.

- 3. Hong S., Pedersen P.L., ATP Synthase and the Actions // Microbiol. Mol. Biol. Rev. -2008; 72: 590–641.
- 4. Ahmad Z., Hassan S.S., Azim S.A. Therapeutic Connection between Dietary Phytochemicals and ATP Synthase // Current medicinal chemistry. 2017; 24(35): 3894—3906.
- 5. Ishmukhametov R.R., Galkin M.A., Vik S.B. Ultrafast purification and reconstitution of His-tagged cysteine-less Escherichia coli F1Fo ATP synthase // Biochim Biophys Acta. 2005; 1706(1-2): 110-116.
- 6. Ishmukhametov R.R., Russell A.N., Berry R.M. A modular platform for one-step assembly of multi-component membrane systems by fusion of charged proteoliposomes. // Nat Commun. -2016; 7: 13025.
- 7. Galkin M.A., Russell A.N., Vik S.B., Berry R.M., Ishmukhametov R.R. Detergent-free Ultrafast Reconstitution of Membrane Proteins into Lipid Bilayers Using Fusogenic Complementary-charged Proteoliposomes // J Vis Exp. 2018; 134: 56909.

УДК 616

Бландов А.Н.¹, Шлейкин А.Г.², Кружляк Петер (Kruzliak Peter)³, Муста Оглы Н.М.⁴ Частное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский медико-социальный институт»^{1,2}, Санкт-Петербург, Россия Масарикский университет³, Брно, Республика Чехия Университет ИТМО⁴, Санкт-Петербург, Россия blandov.2015@yandex.ru¹, shleikin@yandex.ru², ruzliakpeter@gmail.com³, nargul_m@mail.ru⁴

Источники канцерогенов и механизмы возникновения рака

Опасные для здоровья последствия воздействия канцерогенов вызываются появлением электрофилов или образованием активных форм кислорода. Существует взаимосвязь между факторами образа жизни, включая агрессивную термообработку пищевых продуктов, табачный дым и другие канцерогены окружающей среды и злокачественной трансформацией клеток.

Ключевые слова: канцерогены, электрофилы, активные формы кислорода, полиядерные ароматические углеводороды (ПАУ).

Blandov A.N.¹, Shleikin A.G.², Kruzliak P.³, Musta Ogly N.M.⁴
Private Higher Education Institution «St. Petersburg Medical
and Social Institute»^{1,2}
Masaryk University, Brno, Czech Republic³,
ITMO University⁴, St. Petersburg, Russia

The sources of carcinogens and mechanisms of cancer

The hazardous health effects of exposure to carcinogens are caused by the appearance of electrophiles or reactive oxygen species. There is a relationship between lifestyle factors, including aggressive food heat treatment, tobacco smoke and other environmental carcinogens, and malignant cell transformation.

Key words: carcinogens, electrophiles, reactive oxygen species, heterocyclic aromatic amines (HAAs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitrosamines

Злокачественные заболевания являются очень актуальной темой медицинских и биологических исследований. Люди постоянно подвергаются воздействию веществ с мутагенными и/или канцерогенными свойствами. Они могут быть эндогенными продуктами нормального метаболизма или патофизиологического состояния, или экзогенными, поступающими из воздуха, воды или пищи [1]. Канцерогены вызывают повреждения ДНК, включая одно- или двухцепочечные разрывы, ковалентно-связанные аддукты ДНК, сшивки ДНК-ДНК или ДНК-белок, или повреждения, вызванные окислением [3]. Такие факторы образа жизни, как режим питания или курение, увеличивают действие химических канцерогенов на человека. Основным источником гетероциклических ароматических аминов (ГАА), активирующих канцерогенез, является белковая пища, приготовленная при высоких температурах. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и нитрозамины в основном генерируются при использовании табачных изделий [2].

Химические канцерогены определяются как агенты, вызывающие рак у людей и экспериментальных животных. Было показано, что химические канцерогены могут влиять на все стадии канцерогенеза. Что касается патогенных механизмов канцерогенов, они делятся на две категории [5]: негенотоксичные агенты, которые составляют 10–20% всех канцерогенов [6] и генотоксичные (вызывающие изменения в апоптозе, пролиферации клеток, межклеточной взаимосвязи, а также стимулирующих окислительные повреждения) [5]; эпигенетические факторы обычно влияют одновременно на большее число путей [7]. Генотоксичные канцерогены вызывают повреждение ДНК либо не-

посредственно, либо после метаболической активации вследствие их электрофильной активности. Электрофилы – это электронодефицитные молекулы, которые образуют аддукты с внутриклеточными нуклеофильными макромолекулами [8]. В случае, если репаративные механизмы до репликации не могут исправить повреждение, образование аддуктов ДНК приводит к канцерогенезу [5]. Поскольку экзогенные вещества связаны с продукцией реактивных электрофильных частиц (РЭЧ), существует связь между РЭЧ и аддуктами ДНК, мутациями и раком. Большинство известных канцерогенов считаются генотоксичными, и в отличие от негенотоксичных канцерогенов, не существует их безопасной дозы или порога воздействия. Важно, что канцерогены прямого действия, независимые от активации, взаимодействуют непосредственно с ДНК или клеточными компонентами благодаря электрофильным группам, в то время как канцерогены, зависимые от активации, непрямого действия, требуют активации в электрофильные формы, оказывающие генотоксическое воздействие [3]. Следовательно, повреждающие эффекты канцерогенных агентов вызываются экзогенно или метаболически генерируемыми электрофилами и активными формами кислорода (АФК) [9].

Свободный радикал определяется как свободно существующая частица, которая содержат неспаренный электрон. Обычно они нестабильны и обладают высокой реакционной способностью [10]. АФК, образующиеся в избыточном количестве, способствуют повреждению клеточных структур благодаря их способности окислять липиды биологических мембран, а также белки: ферменты, рецепторы, мембранные транспортеры. Образование свободных радикалов и других АФК происходит через метаболические процессы или внешние источники, включая загрязнители воздуха, сигаретный дым, радиацию, а также тяжелые металлы, промышленные растворители, некоторые лекарства, пестициды [11]. Свободные радикалы являются продуктами ферментативных реакций, таких как цепь тканевого дыхания, синтез простагландинов, ксантиноксидазные реакции, фагоцитоз и других, а также неферментативных реакций кислорода с органическими соединениями, и реакций, вызываемых ионизирующими излучениями [10]. Из-за воздействия на окружающую среду стрессовых факторов и ксенобиотиков, способствующих увеличению выработки АФК [12], даже низкие дозы канцерогенов во внутренней среде человека, особенно в условиях отказа механизмов репарации ДНК, могут быть связаны с повреждением ДНК и раком. Реакции АФК с ДНК приводят к образованию аддуктов ДНК [10]. Нарушение баланса между АФК и системой антиоксидантной зашиты происходит на всех этапах канцерогенеза, поскольку раковые клетки связаны с увеличением выработки АФК из-за аберрантного метаболизма, потребности в энергии [4], пероксисомальной активности, активации онкогенов и дисфункции митохондрий. АФК также участвуют в повышении кровоснабжения опухолей и метастазировании. Кроме того, АФК могут изменять гены, связанные с апоптозом, пролиферацией и факторами транскрипции [4]. Тем не менее, ферментативные антиоксиданты, такие как супероксиддисмутаза (СОД), ферменты каталазной или глутатионовой системы (глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза), а также неферментативные антиоксиданты (витамин Е, витамин С, глутатион, многочисленные пищевые вещества растений) прямо или косвенно защищают биомолекулы от окислительного повреждения [10].

Как указывалось ранее, большинство канцерогенов окружающей среды существуют в форме проканцерогенов и, следовательно, требуют метаболической активации. Однако метаболические процессы могут приводить к инактивации, детоксикации, увеличению растворимости в воде и выведению из организма. Биоактивация канцерогенов в реактивные электрофилы, которые способны ковалентно связываться с ДНК [13], происходит главным образом с участием ферментов, метаболизирующих ксенобиотики, в основном содержащих цитохром P-450 (СҮР) [3].

ГАА и ПАУ способны инициировать рак в различных типах тканей. Их канцерогенность связана с взаимодействием с арилуглеводородным рецептором (AyP), который определяется как лиганд-активируемый фактор транскрипции [2]. ГАА присутствуют в обработанной богатой белком пище, такой как мясо, когда оно готовится при высокой температуре, что объясняется неферментативной реакцией между сахарами, аминокислотами и креатином, протекающими при температуре выше 150°С [15]. Так, 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]пиридин (PhIP), который Международным агентством по исследованию рака (МАИР) классифицируется как возможно канцерогенный для человека [13], является одним из наиболее распространенных ГАА, образующихся в мясе, а также в табачном дыме [16].

Кроме того, B[а]Р является лигандом AyP [17] и определяется как член ПАУ, который биологически превращается в канцерогенную эпокись бензо(а)пирена, способствующую образованию аддуктов и мутаций ДНК [18]. B[а]Р считается одним из самых мощных канцерогенных агентов, его действие связано со злокачественными опухолями человека, включая рак легких, мочевого пузыря, кожи, поло-

сти рта и пищевода [19]. Богатая белками пища, приготовленная при высокой температуре, и использование табачных изделий являются хорошо известными источниками ГАА [15]. PhIP (2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]пиридин), как один из наиболее распространенных ГАА, связан с индукцией нескольких типов злокачественных новообразований, включая рак молочной железы, толстой кишки или простаты [18], и считается повреждающим ДНК, мутагенным и эстрогенным агентом с токсичностью, связанной с СУР-опосредованной метаболической активацией [21]. Факторы окружающей среды, в основном табачный дым, содержащий более 60 различных канцерогенов, тесно связаны с раком легких [14]. ПАУ и никотин вместе с ННК являются компонентами табачного дыма, вызывающими изменение генов, участвующих в апоптозе и репарации ДНК. Следовательно, В[а]Р (бензо(а)пирен) играет решающую роль в канцерогенезе легких, поэтому модель В[а]Р-индуцированного рака легких у мышей широко используется для оценки эффективности натуральных продуктов [22].

Метаболически активированные табачные специфические нитрозамины 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон (ННК) и N'-нитрозонорникотин (ННН), которые МАИР классифицируют как канцерогенные для человека, также способствуют образованию аддуктов ДНК и онкогенезу. Кроме того, их связывание с никотиновым рецептором ацетилхолина способствует росту рака через усиление пролиферации, выживания, миграции и инвазии [20]. 4-(Метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанол (NNAL) является метаболитом ННК, который считается сильным канцерогеном и способствует развитию рака легких, поджелудочной железы и других типов Он обнаружен в моче как курильщиков, так и некурящих под действием пассивного курения [20]. У курильщиков с плоскоклеточным раком полости рта, головы или шеи найдены более высокие уровни повреждения ДНК, вызванной специфическими для табака нитрозаминами, по сравнению с курильщиками без рака со схожим уровнем воздействия канцерогена и никотина в обеих группах. Следовательно, образование аддуктов ДНК, независимых от индикаторов воздействия канцерогена, может предшествовать развитию рака у курильщиков [23].

Список литературы

1. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. Semin Cancer Biol. 2004;14:473–86.

- 2. Powell JB, Ghotbaddini M. Cancer-promoting and inhibiting effects of dietary compounds: role of the Aryl hydrocarbon receptor (AhR). Biochem Pharmacol (Los Angel). 2014;3:1.
- 3. Barnes JL, Zubair M, John K, Poirier MC, Martin FL. Carcino-gens and DNA damage. Biochem Soc Trans. 2018;46:1213–24.
- 4. Liu Z, Ren Z, Zhang J, et al. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. Front Physiol. 2018;9:477.
- 5. Lee SJ, Yum YN, Kim SC, et al. Distinguishing between geno-toxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by gene expression profiling and bioinformatic pathway analysis. Sci Rep. 2013;3:2783.
- 6. Wilde EC, Chapman KE, Stannard LM, et al. A novel, integrated in vitro carcinogenicity test to identify genotoxic and non-genotoxic carcinogens using human lymphoblastoid cells. Arch Toxicol. 2018;92:935–51.
- 7. van Delft JH, van Agen E, van Breda SG, Herwijnen MH, Staal YC, Kleinjans JC. Discrimination of genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling. Carcinogenesis. 2004;25:1265–76.
- 8. Sakanyan V. Reactive chemicals and electrophilic stress in cancer: a minireview. High Throughput. 2018;7(2):pii: E12.
- 9. Talalay P, Fahey JW. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. J Nutr. 2001;131:3027S-33S.
- 10. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010;4:118–26.
- 11. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian J Clin Biochem. 2015;30:11–26.
- 12. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:8416763.
- 13. Krais AM, Speksnijder EN, Melis JPM, et al. Metabolic activation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine and DNA adduct formation depends on p53: studies in T rp53(\pm), T rp53(\pm) and T rp53(\pm) mice. Int J Cancer. 2016;138:976–82.
- 14. Anttila S, Raunio H, Hakkola J. Cytochrome P450—mediated pulmonary metabolism of carcinogens. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011;44:583—90.
- 15. Jamali MA, Zhang Y, Teng H, Li S, Wang F, Peng Z. Inhibitory effect of rosa rugosa tea extract on the formation of heterocyclic amines in meat patties at different temperatures. Molecules. 2016;21:173.
- 16. Reed L, Arlt VM, Phillips DH. The role of cytochrome P450 enzymes in carcinogen activation and detoxication: an in vivo-in vitro paradox. Carcinogenesis. 2018;39:851–9.

- 17. Hardonnière K, Saunier E, Lemarié A, et al. The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces a Warburg-like metabolic reprogramming dependent on NHE1 and associated with cell survival. Sci Rep. 2016;6:30776.
- 18. Ochieng J, Nangami GN, Ogunkua O, et al. The impact of low-dose carcinogens and environmental disruptors on tissue invasion and metastasis. Carcinogenesis. 2015;36(Suppl 1):S128–59.
- 19. Chappell G, Pogribny IP, Guyton KZ, Rusyn I. Epigenetic alterations induced by genotoxic occupational and environmental human chemical carcinogens: a systematic literature review. Mutat Res Rev Mutat Res. 2016;768:27–45.
- 20. Hecht SS, Stepanov I, Carmella SG. Exposure and metabolic activation biomarkers of carcinogenic tobacco-specific nitrosa- mines. Acc Chem Res. 2016;49:106–14.
- 21. Hudlikar RR, Venkadakrishnan VB, Kumar R, et al. Polymeric black tea polyphenols (PBPs) inhibit benzo(a)pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1- butanone-induced lung carcinogenesis potentially through down-regulation of p38 and Akt phosphorylation in A/J mice. Mol Carcinog. 2017;56:625–40.
- 22. Nooshinfar E, Bashash D, Abbasalizadeh M, Safaroghli-Azar A, Sadreazami P, Akbari ME. The molecular mechanisms of tobacco in cancer pathogenesis. Iran J Cancer Prev. 2017;10:10.
- 23. Chao MR, Cooke MS, Kuo CY, et al. Children are particularly vulnerable to environmental tobacco smoke exposure: evidence from biomarkers of tobacco-specific nitrosamines, and oxidative stress. Environ Int. 2018;120:238–45.

УДК 616

Великанова Л.И., Шафигуллина З.Р., Ворохобина Н.В., Малеваная Е.В.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург Velikanova46@gmail.com

Основные варианты стероидных профилей мочи при адренокортикальном раке на основе метода газовой хромато-масс-спектрометрии

Исследованы стероидные профили мочи (СПМ) методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС) у 38 больных с адренокортикальным раком (АКР) и 45 пациентов с адренокортикальной

аденомой. Получены 20 основных биомаркеров АКР с чувствительностью и специфичностью более 90% и 3 варианта СПМ АКР с повышением экскреции с мочой: THS и андрогенов у 71,05%, THS — у 15,8%, андрогенов — у 13,15% пациентов с АКР. Увеличение экскреции с мочой прегнандиола, прегнантриола и 5-ен-прегненов получены у больных АКР при всех 3 вариантах ГХ-МС СПМ.

Ключевые слова: адренокортикальный рак, стероидные профили мочи, газовая хромато-масс-спектрометрия.

Velikanova L.I., Shafigullina Z.R., Vorokhobina N.V., Malevanaya E.V.

FSBEI HE «North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov» under the Ministry of Public Health of Russian Federation, St. Petersburg

Variants of urine steroid profiles in adrenocortical cancer based on gas chromatography-mass spectrometry method

Urine steroid profiles (USP) of 38 patients with adrenocortical cancer (ACC) and 45 patients with adrenocortical adenoma were studied by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). We got 20 major ACC biomarkers which showed more than 90% sensitivity and specifity. Three USP types with increasing of androgens along with THS (in 71.05% of cases), THS (in 15.8% of cases), androgens (in 13.15% of cases) are characterized for ACC patients. An enhance of urinary excretion of pregnanediol, pregnanetriol and 5-en-pregnenes was observed in ACC patients with all 3 types of GC-MS-based USP.

Key words: adrenocortical cancer, urine steroid profiles, gas chromatographymass spectrometry.

Введение. В настоящее время наиболее информативными для изучения метаболизма стероидных гормонов являются хроматографические методы анализа [1-4]. Исследование стероидных профилей мочи (СПМ) методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) дает возможность изучить метаболомику большого спектра андрогенов, глюкокортикоидов и их предшественников за один анализ [1-2]. Многие исследователи считают, что исследование СПМ методом ГХ-МС является высокочувствительным и специфическим биомаркерным методом, позволяющим дифференцировать доброкачественные опухоли надпочечников от злокачественных [5-8].

Материалы и методы исследования. Обследовано 38 больных с АКР с суммой баллов более 3 по шкале L.M. Weiss: 22 пациента с инци-

денталомой коры надпочечников (ИН) с уровнем кортизола менее 50 нмоль/л после подавляющего теста с 1 мг дексаметазона (ПДТ) и 16 пациентов с синдромом Кушинга (СК). 45 пациентов с адренокортикальной аденомой (АКА) без злокачественного потенциала (ЗП) составили группу контроля (ГК). Методом ГХ-МС исследовали СПМ на газовом хромато-масс-спектрометре SHIMADZU GCMS – OP2010 ULTRA. Определено 68 стероидов [2]. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программной системы STATISTICA for WINDOWS (версия 10). Основные количественные характеристики больных представлены в виде медианы (Ме), 25-го перцентиля и 75-го перцентиля ($Q_{25}-Q_{75}$). Для сравнения результатов использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимым считался критерий достоверности p < 0.05. Чувствительность и специфичность была рассчитана по программе Medcalc с использованием метода ROC кривых (receiver operating characteristic) и площади под ROC кривыми (AUC).

Результаты. По данным ГХ-МС установлено 20 основных биомаркеров АКР для больных СК и пациентов с ИН. Получено повышение экскреции с мочой следующих стероидов в сравнении с показателями больных с АКА: тетрагидро-11-дезоксикортизола (THS), дегидроэпиандростерона (DHEA) и его метаболитов [16-OH-DHEA-3β, 17β-андростендиола (dA2-17β), андростентриола (dA3), 16-oxo-dA2], 5β-метаболита андростендиона — этиохоланолона (Et), метаболитов прогестерона и 17-ОН-прогестерона – 17-ОН-прегнанолона (17Р), прегнандиола (Р2), прегнантриола (Р3), 11-охо-Р3, метаболитов прегненолона и 17-OH-прегненолона – прегнендиола (dP2), 3α,17,20прегнентриола $(3\alpha, 17, 20-dP3)$, $3\alpha, 16, 20$ -прегнентриол $(3\alpha, 16, 20-dP3)$ dP3) (табл.1). Кроме этого были определены неклассические 5-епепрегнены, не обнаруженные у пациентов с новообразованиями надпочечников без злокачественного потенциала: 3β,16,20-dP3, 3β,17,20-dP3, 16-OH-прегненолон (16-OH-dP), 21-OH-dP, 11-OHdP3, 21-OH-dP2 (табл. 2).

При проведении ROC анализа экскреции с мочой стероидов больных с новообразованиями коры надпочечников чувствительность и специфичность экскреции с мочой THS, DHEA и его метаболитов, Et, dP2, dP3 и 16-OH-dP2 (AUC 0.97-1.0) составила более 90%, а экскреции с мочой 16-охо-dA2 (AUC 1.0) — 100% для диагностики AKP.

В результате анализа СПМ, полученных методом ГХ-МС, у больных АКР получены 3 варианта СПМ: 1 вариант — повышение экскреции с мочой дегидроэпиандростерона (DHEA), его метаболитов и THS у 71,05% больных, 2 вариант — увеличение экскреции с мочой

ТНЅ при нормальной экскреции с мочой андрогенов у 15,8% пациентов, 3 вариант — повышение экскреции с мочой DHEA и его метаболитов при нормальной экскреции с мочой THS у 13,15% больных АКР. Увеличение экскреции с мочой P2, P3 и 5-епе-прегненов (dP2, dP3, 16-OHdP2), а также определение неклассических 5-епепрегненов было получено у больных АКР при всех 3-х вариантах ГХ-МС СПМ (рис.1, табл. 3).

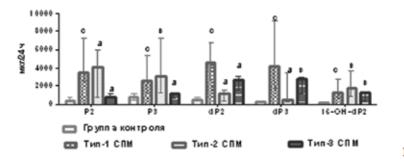


Рис. 1. Экскреция с мочой прегнандиола (P2), прегнантриола (P3) и 5-епепрегненов (dP2 — прегнендиол, dP3 — прегнентриол, 16-OH-dP2) у больных AKP с различными типами ГХ-МС стероидных профилей мочи (СПМ)

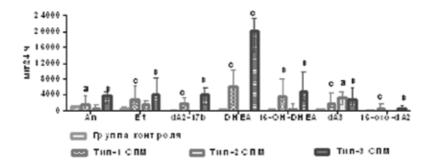


Рис. 2. Метаболомика андрогенов у больных адренокортикальным раком с различными типами ГХ-МС стероидных профилей мочи (СПМ)

Примечания: Ап — андростерон, Et — этиохоланолон, dA2-17 β — андростендиол-17 β , DHEA—дегидроэпиандростерон, dA3—андростентриол. а — p<0.05, в<0.001, c<0.0001.

Основными биомаркерами АКР были DHEA и THS. Следует отметить, что экскреция с мочой DHEA (>2500 мкг/24 ч) была повышена у 83,2% больных с АКР, экскреция с мочой THS (>1500 мкг/24 ч) была увеличена у 86,85% пациентов. Метаболомика андрогенов и экскреция с мочой THS у пациентов с АКР с различными вариантами СПМ представлена на рис. 2 и 3.

Тип 1 СПМ — повышение экскреции с мочой DHEA, его метаболитов и THS; Тип 2 СПМ — увеличение экскреции с мочой THS при нормальной экскреции с мочой андрогенов; Тип 3 СПМ — повышение экскреции с мочой DHEA и его метаболитов при нормальной экскреции с мочой THS.

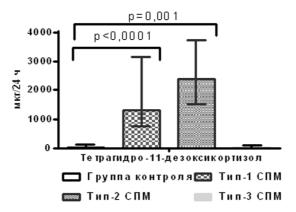


Рис. 3. Экскреция с мочой тетрагидро-11-дезоксикортизола у больных адренокортикальным раком с различными типами ГХ-МС стероидных профилей мочи (СПМ)

Заключение. На основании исследования СПМ методом ГХ-МС получены 20 общих биомаркеров АКР для пациентов с злокачественной кортикостеромой и ИН с уровнем кортизола менее 50 нмоль/л после ПДТ с 1 мг с чувствительностью и специфичностью более 90%. Получены 3 варианта ГХ-МС СПМ у больных АКР с повышением экскреции с мочой у 71,05% — андрогенов и ТНЅ, у 15,8% — ТНЅ при нормальной экскреции с мочой андрогенов, у 13,15% — андрогенов нормальной экскреции с мочой ТНЅ. Увеличение экскреции с мочой прегнандиола, прегнантриола и 5-епе-прегненов получены у больных АКР при всех 3 вариантах ГХ-МС СПМ. Полученные данные дают основание считать исследование СПМ методом ГХ-МС чувствительным и специфичным в дифференциальной диагностике АКР и АКА.

Таблица 1. Экскреция с мочой основных биомаркеров адренокортикального рака (АКР), полученная методом газовой хромато-масс-спектрометрии

	Me (Q25-		
Название стероидов	Группа контроля n=45	Пациенты с АКР с уровнем кортизола после ПДТ <50 нмоль/л n=22	Пациенты со злокачественной кортикостеромой n=16
Этиохоланолон (Et)	365 (169–616)	2159 (1377–6445) p<0,0001	4625 (1633-10765) p<0,0001
Андростендиол-17β (dA2-17β)	73 (45–104)	1233 (670–2292) p<0,0001	2310 (1125-3756) p<0,0001
Дегидроэпиандро- стерон (DHEA)	56 (43–122)	5570 (1547–27355) p=0,0002	6593 (1562-14700) p<0,0001
16α-ΟΗ-DΗΕΑ-3β	168 (64–257)	1056 (718–1487) p=0,0003	2517 (1167-4897) P=0,0008
Андростентриол (dA3)	154 (105–266)	1630 (874–4462) P<0,0001	2884 (2000-5820) p<0,0001
16-oxo-dA2	15 (11–24)	596 (183–1943) p=0,0004	1227 (324-2189) p<0,0001
17-ОН-прегнанолон (17-ОНР)	97 (42–204)	1112 (500–1363) p<0,0001	1124 (653-2329) p<0,0001
Прегнандиол (Р2)	228 (181–409)	2805 (1100–4754) p<0,0001	3677 (2700-15043) p<0,0001
Прегнантриол (Р3)	538 (334–781)	1762 (1086–4915) p=0,0002	5079 (1846-6991) p<0,0001
11-oxo-P3	37 (33–101)	177 (104–519) p=0,006	272 (127-675) p=0,0002
Прегнендиол (dP2)	433 (250–564)	3131 (2143–4984) p<0,0001	5519 (2385-11340) p<0,0001
3α,16,20- прегнентриол (16-OH-dP2)	112 (67–189)	1053 (360–2000) p<0,0001	2715 (600-4124) p<0,0001
3α,17,20- прегнентриол (dP3)	172 (116–268)	2026 (1112–3556) p<0,0001	9142 (3576-13621) p<0,0001
Тетрагидро-11- дезоксикортизол (THS)	49 (37–65)	1246 (626–2719) p<0,0001	2100 (1081-3732) p<0,0001

Примечание: p — достоверность различий показателей пациентов с AKP в сравнении с показателями пациентов с адренокортикальной аденомой без злокачественного потенциала по шкале L.M.Weiss.

Таблица 2. Экскреция неклассических 5-епе-прегненов с мочой у пациентов с АКР с различными вариантами стероидных профилей мочи

Название стероидов	Me (Q25-Q75), мкг/24 ч			
ттазвание стероидов	Тип 1	Тип 2	Тип 3	
16-OH- прегненолон (16dP)	402 (221-1798)	648 (85-1212)	325 (58-636)	
21-ОН-прегненолон (21dP)	372 (205-2183)	248 (70-414)	181 (130-688)	
3β,17,20-прегнентриол (dP3-3β)	989 (440-1946)	224 (165-420)	325 (195-371)	
3β,16,20-прегнентриол (16-OH-dP2-3β)	989 (485-1400)	628 (300-957)	750 (616-2275)	
21-OH-прегнендиол (21-OH-dP2)	971 (329-2195)	157 (35-315)	-	
11-ОН-прегнентриол (11-dP3)	565 (169-1408)	297 (52-582)	247 (104-488)	

Список литературы

- 1. Taylor N. F. Urinary steroid profiling // Methods Mol. Biol. 2013. V. 1065, P. 259–276.
- 2. Velikanova L.I., Strelnikova E.G., Obedkova E.V., Krivokhizhina N.S., Shafigullina Z.R., Grigoryan K. et al. Generation of urinary steroid profiles in patients with adrenal incidentaloma using gas chromatography—mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* 2016; 71 (7): 748-54.
- 3. Krone N, Hughes BA, Lavery GG, Stewart PM, Arlt W, Shackleton CH. 2010. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). J Steroid Biochem Mol Biol..121(3-5):496-504. doi: 10.1016/j. jsbmb.2010.04.010.
- 4. McDonald J.G., Matthew S., Auchus R.J. Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases. Horm. Cancer. 2011; 2 (6): 324–32.
- 5. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libé R, Hughes BA, Schneider P, Smith DJ, Stiekema H, Krone N, Porfiri E, Opocher G, Bertherat J, Mantero F, Allolio B, Terzolo M, Nightingale P, Shackleton CH, Bertagna X, Fassnacht M, Stewart PM. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancyin adrenal tumors. J Clin Endocrinol Metab 2011: 96:1565-1574.
- 6. Velikanova LI, Shafigullina ZR, Lisitsin AA, Vorokhobina NV, Grigoryan K, Kukhianidze EA et al. Different types of urinary steroid profiling obtained by high-performance liquid chromatography and

gas chromatography-mass spectrometry in patients with adrenocortical carcinoma. Horm Cancer 2016; 1-9.

- 7. Шафигуллина З.Р., Великанова Л.И., Ворохобина Н.В., Лисицын А.А., Кухианидзе Е.А., Стрельникова Е.Г. и др. Диагностическое значение стероидных профилей биологических жидкостей у больных синдромом Иценко Кушинга. *Проблемы эндокринологии*. 2015; 61 (4): 4-8.
- 8. Hines J.M., Bancos I., Bancos C., Singh R.D., Avula A.V., Young W.F. et al. High-Resolution, Accurate-Mass (HRAM) Mass Spectrometry Urine Steroid Profiling in the Diagnosis of Adrenal Disorders. Clin. Chem. 2017; 63(12):1824–35.

УДК 57.023

Власова Ю.А.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург yuliya.vlasova@szgmu.ru

Защитный и антиоксидантный эффект ганглиозидов

В статье обсуждаются современные представления о влиянии ганглиозидов на микрогетерогенность клеточных мембран и структуру липидных рафтов; участие ганглиозидов в процессах межклеточного взаимодействия и адгезии, роли ганглиозидов в рецепции и модуляции внутриклетоных сигнаов и влиянии этих процессов на протекторный и антиоксидантный эффект ганглиозидов.

Ключевые слова: ганглиозиды, трансдукция сигнальных систем, антиоксидантный эффект, нейропротекция.

Vlasova Yu.A.

Protective and antioxidant effect of gangliosides

In this review discuss the current understanding on role of gangliosides on microheterogeneity cell membranes and structure of lipid rafts; involvement of gangliosides in the processes of cell-cell interaction and adhesion; function of gangliosides as receptor and modulator of intracellular signals and influence these processes on protective and antioxidant effects of gangliosides.

Key words: gangliosides, signal system transduction, antioxidant effect, neuroprotection

Ганглиозиды — гликосфинголипиды, являющиеся компонентами мембран клеток различных органов, но при этом в наиболее высоких концентрациях они обнаружены в нервной ткани. Однако, несмотря на огромное разнообразие (на сегодняшний день идентифицированное более 180 различных ганглиозидов [1]), в мозге они представлены преимущественно лишь четырьмя типами молекул — GM1, GD1a, GD1b и GT1b, на долю которых в различных областях мозга приходится, примерно 80-90% от общего числа ганглиозидов [2].

История изучения ганглиозидов началась в 1935 году, когда Эрнст Кленк, обнаружил новый тип гликолипидов в тканях мозга больных, погибших от семейной амавротической идиотии (болезнь Тея-Сакса). Немного позднее, в 1942 году, Кленком было дано новое название — ганглиозиды, подчеркивающее то, что впервые они были выделены из ганглиозных клеток нервной ткани.

На сегодняшней день накопилось огромное количество работ, свидетельствующих об участии ганглиозидов в самых разнообразных процессах: межклеточного взаимодействия, рецепции прионов, вирусов и токсинов, трансдукции внутриклеточных сигнальных систем; оказывают нейропротекторное, адаптогенное и антиоксидантное лействие.

Доминирующей в проявлении физических, химических и иммунологических свойств ганглиозидов является гидрофильная олигосахаридная часть, обращенная в межклеточное пространство и обеспечивающая взаимодействие с различными внеклеточными молекулами, в том числе токсинами, компонентами матрикса и молекулами адгезии [3, 4].

Ганглиозиды не расположены равномерно по всей поверхности мембраны, а сконцентрированы в организованных микродоменах — липидных рафтах [5, 6, 7]. Ганглиозиды обнаружены в составе липидных рафтов особого типа-кавеол, характерной чертой которых является присутствие интегрального мембранного белка кавеолина. Кавеолин способен формировать сигналосомы, поддерживать целостность липидных рафтов, координировать и регулировать передачу сигналов внутрь клетки. В состав кавеол входят NO-синтазы, рецепторы EGFR, киназы семейства Src, G-белки (H-Ras) и другие сигнальные молекулы [8, 9, 10].

Ганглиозиды модулируют адгезию, опосредуемую интегриновыми рецепторами в различных типах клеток [11]. GT1b, как и GM3 способен ингибировать клеточную миграцию в фибронектине [12, 13]. GM1, GM3, GD3, GD1a, GD1b и GT1b способны модулировать адгезию различных типов клеток глиомы человека к фибронекти-

ну, ламинину, витронектину и коллагену I [13]. Кроме того, GD1a и GM1 являются функциональными лигандами для миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG). Установлено, что взаимодействие ганглиозид-MAG способно усиливает стабильность и обеспечивать оптимальные межклеточные взаимодействия [14]. GM1 является основным рецептором для галектина-1, принимающего участие в процессах клеточной адгезии и регуляции клеточного цикла [15].

Ганглиозиды усиливают действие полиоматоксина SV40-онкогеновируса [16]. GM1 является высоко специфическим рецептором β-субъединицы токсина холеры. Токсический эффект холерного токсина прямо пропорционален содержанию ганглиозида на поверхности клеток [17].

GM1 является лигандом для С-концевого участка прионов [18]. Ассоциация приона (PrP) и ганглиозида играет важную роль в модуляции восприимчивости к болезни. Возможно, что существование специфических белково-липидных взаимодействий и объясняет отличия в поведении прионов при заражении различных клеточных линий. Высказано предположение, что разные штаммы прионов имеют специфическое сродство к определенным нейронам, в зависимости от их липидного, и в частности ганглиозидного состава [18].

Важно отметить, что при взаимодействии как токсинов, так и вирусов с ганглиозидным рецептором, не происходит их обезвреживание; а наоборот, наблюдается реализация токсического эффекта. Возможное объяснение заключается том, что в процессе эволюции токсины и вирусы смогли выработать у себя способность использовать клеточные ганглиозидные рецепторы, функции которых заключаются во взаимодействии с эндогенными физиологически активными соединениями.

Авторы исследования, проведенного на субклонах F11 нейрональной гибридной линии, предполагают, что в физиологических условиях протеолиз прионов запускает процессы регенерации миелиновой оболочки [19]. Если результаты подтвердятся и на других клеточных моделях, то можно будет предположить, что способность ганглиозидов связываться с прионами имеет важное значение для нормального функционирования миелиновой оболочки.

Роль ганглиозидов в модуляции систем трансдукции сигнала, защитный и антиоксидантный эффекты.

Нейропротекторный эффект ганглиозидов обусловлен прежде всего активацией тирозинкиназы Trk-рецепторов. Причем GM1 спо-

собен активировать различные типы Trk-рецепторов — A, B и C. GM1 потенцирует аутофосфорилирование рецепторов активируя тирозинкиназу Trk-рецепторов [20]. Также GM1 участвует в активации протеинкиназ, лежащих «ниже по течению» ("downstream") от тирозинкиназы Trk-рецепторов. Было показано, что GM1 в стриатуме мозга крыс активирует ERK1 и ERK2 (преимущественно ERK2), PI3K и Akt [20], дальнейшую активацию протеинкиназ ERK1/2, Akt и протеинкиназы C.

Еще одним из путей влияния ганглиозидов на активность различных рецепторов является изменение гетерогенности мембран и структуры рафтов, в формировании которых ганглиозиды играют важнейшую роль. Было показано, что защитный эффект ганглиозидов GM1 и GD1а против действия ЛПС (бактериального липополисахарида) связан с изменением состава и структуры липидных рафтов, вызванного влиянием экзогенных ганглиозидов, встраивание которых в мембраны нарушает переход рецепторов TLR4 в состав рафтов и снижает токсическое действие ЛПС [21].

Двукратное введение ганглиозида GM1 значительно снижает не только частоту и выраженность эпилептических припадков, индуцированных метилмалоновой кислотой [22], но и значительно уменьшает в стриатуме крыс накопление таких продуктов ПОЛ, как малоновый альдегид и другие соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой. Введение ганглиозида GM1 крысам снижает интенсивность и длительность судорожных припадков, вызванных глутаровой кислотой, и уменьшает накопление малонового диальдегида в стриатуме животных [22]. В работе Furian и соавторов [23] в опытах in vivo было подтверждено, что ганглиозид GM1 увеличивает активность каталазы, оказывает вазодилитирующее действие. GM1 при добавлении в перфузионную жидкость способен защищать изолированное сердце от последствий окислительного стресса, достоверно снижения образование продуктов ПОЛ [24].

Антиоксидантный эффект ганглиозидов был показан и на клеточной линии F258, происходящей из эпителиальных клеток печени. В клетках F258 GM1 снижает продукцию АФК и ПОЛ, индуцированную бензо[а]пиреном [25].

Важно отметить, что для осуществления ганглиозидами их антиоксидантного эффекта необходимо нативное состояние белков клеточных мембран и модуляция активности сигнальных систем. Так, антиоксидантные эффекты ганглиозидов, не проявлялись в липосомах, приготовленных из липидов мозга. Температурная денатурация синаптосом также приводила к потере антиоксидантно-

го эффекта ганглиозида GM1 [26]. Кроме того, в опытах, проведенных на синаптосомах, были получены данные, демонстрирующие что в присутствии неспецифического ингибитора протеинкиназ полимиксина В ганглиозиды теряют способность снижать накопление МДА, индуцированное системой Fe^{2+} - аскорбат [26].

В литературе имеются многочисленные свидетельства того, что окислительный стресс приводит к потере активности Na^+ , K^+ - $AT\Phi$ азы [22]. Инактивация Na^+ , K^+ - $AT\Phi$ азы, вызванная в синаптосомах мозга крыс системой Fe^{2+} аскорбат или действием глутамата, может быть предотвращена действием антиоксидантов, например, альфа-токоферола, или ферментов антиоксидантной защиты — супероксиддисмутазой [27]. Такой же эффект на активацию Na^+ , K^+ - $AT\Phi$ азы в синаптосомах мозга оказывает и ганглиозид GM1, который предотвращает окислительную инактивацию фермента.

В опытах *in vivo* GM1 нормализует активность Na⁺, K⁺-ATФазы, сниженную при ишемии мозга крыс, для которой характерна активациях свободно-радикальных процессов [28]. GM1 способен предотвращать окислительную инактивацию Na+, K+-ATФазы. Так, при введении глутаровой кислоты и других токсинов, ганглиозид снижал степень инактивации Na+, K+-ATФазы в стриатуме мозга крыс, и уменьшал образование продуктов ПОЛ [22]. На примере GMI и GDIa было показано, что ганглиозиды обладают защитным эффектом при действии на клетки РС12 в условиях окислительного стресса как в микро-, так и в наномолярных концентрациях, которые являются физиологическими концентрациями ганглиозидов в спинномозговой жидкости. GMI в наномолярных концентрациях снижает образование активных форм кислорода (АФК), индуцированное $H_2O_2[29, 30,$ 31. Зависимость защитного и метаболических эффектов ганглиозида GM1 в клетках PC12 при действии на них H_2O_2 от модуляции активности тирозинкиназы Trk рецепторов (т.е. от одной и той же сигнальной системы) согласуется с представлениями о существенной роли антиоксидантного эффекта GMI в повышении им жизнеспособности клеток.

Дальнейшее изучение антиоксидантых и протекторных свойств ганглиозидов, а также вовлеченых в эти процессы сигнальных систем клетки и более детальное изучение механизмов действия ганглиозидов, может дать важную информацию не только для понимания природы биологический активности этих молекул, но и для разработки лекарственных средств, направленных на нейропротекцию и снижение уровня окислительного стресса.

Список литературы

- 1. Yu R.K., Tsai Y.T., Ariga T. 2012. Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances. Neurochem. Res. **37** (6), 1230-1244
- 2. Kracun I., Rosner H., Drnovsek V., Vukelic Z., Cosovic C., Trbojevic-Cepe M., Kubat M. 1992. Gangliosides in the human brain development and aging Neurochem.Int. **20** (3), 421-431.
- 3. Yates A.J., Rampersaud A. 1998. Sphingolipids as receptor modulators. An overview. Ann. N.Y. Acad. Sci. **845**, 57-71.
- 4. Glebov O.O., Nichols B.J. 2004. Distribution of lipid raft markers in live cells. Biochem. Soc. Trans. **32** (5), 673-675.
- 5. Ledeen, R.W., Wu G., Andre S., Bleich D., Huet G., Kaltner H., Kopitz J., Gabius H.2012. Beyond glyco-proteins as galectin counterreceptors: tumor-effector T cell growth control via ganglioside GM1. Ann. N.Y. Acad. Sci.1253, 206–221.
- 6. Simons K., Ehehalt R. 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. J. Clin. Invest. 2002. **110** (5), 597-603.
- 7. Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature. 1997. **387** (633), 569-572.
- 8. Liu J.R., Ding M.P., Wei E.Q., Luo J.H., Song Y., Huang J.Z., Ge Q.F., Hu H., Zhu L.J. 2005. GM1 stabilizes expression of NMDA receptor subunit 1 in the ischemic hemisphere of MCAo/reperfusion rat. J. Zhejiang. Univ. Sci. B. 6 (4), 254-258.
- 9. Levental I., Grzybek M., Simons K. 2011. Raft domains of variable properties and compositions in plasma membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **108** (28), 11411-11416.
- 10. Staubach S., Hanisch F.G. 2011. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. Expert Rev. Proteomics.8 (2), 263-277.
- 11. Itokazu Y., Pagano R.E., Schroeder A.S., O'Grady S.M., Limper A.H., Marks D.L. 2014. Reduced GM1 ganglioside in CFTR-deficient human airway cells results in decreased β 1-integrin signaling and delayed wound repair. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2014. **306** (9), 819-30.
- 12. Wang X.Q., Sun P., Paller A.S. 2003. Ganglioside GM3 blocks the activation of epidermal growth factor receptor induced by integrin at specific tyrosine sites. J. Biol. Chem. 2003. **278** (49), 48770-48778.
- 13. Merzak A., Koochekpour S., Pilkington G.J. 1995. Adhesion of human glioma cell lines to fibronectin, laminin, vitronectin and collagen I is modulated by gangliosides in vitro. Cell. Adhes. Commun. 3 (1), 27-43.
- 14. Vajn K., Viljetić B., Degmečić I.V., Schnaar R.L., Heffer M. 2013. Differential distribution of major brain gangliosides in the adult mouse central nervous system. PLoS One. **8** (9), 1-11.

- 15. Wu G., Lu Z.H., André S., Gabius H.J., Ledeen R.W. 2016. Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T cell suppression. J. Neurochem. **136** (3), 550-563.
- 16. Luo Y., Motamedi N., Magaldi T.G., Gee G.V., Atwood W.J., Di Maio D. 2016. Interaction between Simian Virus 40 Major Capsid Protein VP1 and Cell Surface Ganglioside GM1 Triggers Vacuole Formation. Am. C. mBio.7 (2), 1-13.
- 17. Wolf A.A., Jobling M.G., Saslowsky D.E., Kern E., Drake K.R., Kenworthy A.K, Holmes R.K., Lencer W.I. 2008. Attenuated endocytosis and toxicity of a mutant cholera toxin with decreased ability to cluster ganglioside GM1 molecules. Infect. Immun. 2008. **76** (4), 1476-1484.
- 18. Sanghera N., Correia B.E., Correia J.R., Ludwig C., Agarwal S., Nakamura H.K., Kuwata K., Samain E., Gill A.C., Bonev B.B., Pinheiro T.J. 2011. Deciphering the molecular details for the binding of the prion protein to main ganglioside GM1 of neuronal membranes. Chem. Biol. 18 (11), 1422-1431.
- 19. Bremer J., Baumann F., Tiberi C., Wessig C., Fischer H., Schwarz P., Steele A.D., Toyka K.V., Nave K.A., Weis J., Aguzzi A. 2010. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. Nat. Neurosci. 2010. **13** (3), 310-318.
- 20. Duchemin A.M., Ren Q., Neff N.H., Hadjiconstantinou M. 2008. GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. J. Neurochem. 2008. **104** (6), 1466-1477.
- 21. Nikolaeva S., Bayunova L., Sokolova T., Vlasova Y., Bachteeva V., Avrova N., Parnova R. 2015. GM1 and GD1a gangliosides modulate toxic and inflammatory effects of E. coli lipopolysaccharide by preventing TLR4 translocation into lipid rafts. BBA- Mol. Cell. Biol. Lipids. **1851** (3), 239-247.
- 22. Fighera M.R., Royes L.F., Furian A.F., Oliveira M.S., Fiorenza N.G., Frussa-Filho R., Petry J.C., Coelho R.C., Mello C.F. 2006. Monosialoganglioside increases catalase activity in cerebral cortex of rats. Neurobiol. Dis. 22 (3), 611-623.
- 23. Furian A.F., Oliveira M.S., Royes L.F., Fiorenza N.G., Fighera M.R., Myskiw J.C., Weiblen R., Rubin M.A., Frussa-Filho R., Mello C.F. 2007. GM1 ganglioside induces vasodilation and increases catalase content in the brain. Free Radic. Biol. Med. 43 (6), 924-932.
- 24. Maulik N., Das D.K., Madhuri G., Gordis G.A., Avrova N.F., Denisova N.A. 1993. Reduction of myocardial ischemic reperfusion injury by sialylated glycosphingolipids, gangliosides . J. Cardiovascular Pharmacol. 22. 74-81.
- 25. Gorria M., Huc L., Sergent O., Rebillard A., Gaboriau F., Dimanche-Boitrel M.T., Lagadic-Gossmann D. 2006. Protective effect of monosialoganglioside GM1 against chemically induced apoptosis through targeting of mitochondrial function and iron transport. Biochem. Pharmacol. 72 (10), 1343-1353.

- 26. Tyurin V.A., Tyurina Yu.Yu., Avrova N.F. 1992. Ganglioside-dependent factor, inhibiting lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. **20**, 401-407.
- 27. Avrova N.F., Victorov I.V., Tyurin V.A., Zakharova I.O., Sokolova T.V., Andreeva N.A., Stelmaschuk E.V., Tyurina Y.Y., Gonchar V.S. 1998. Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. Neurochem. Res. 23, 945-952.
- 28. Mahadik S.P., Bnarucha V.A., Stadlin A., Ortiz A., Karpiak S.E. 1992. Loss and recovery of activities of α^+ and α isozymes of (Na^+,K^+) -ATPase in cortical focal ischemia: GM1 ganglioside protects plasma membrane structure and function. J. Neurosci. Res. **32**, 209-220.
- 29. Власова Ю.А., Захарова И.О., Соколова Т.В., Аврова Н.Ф. 2013. Метаболические эффекты ганглиозида GM1 на клетки PC12 в условиях окислительного стресса зависят от модуляции активности тирозинкиназы Trk рецепторов Ж. эвол. биох.и физиол. 49 (1), 15-2
- 30. Власова Ю.А., Захарова И.О., Соколова Т.В., Фураев В.В., Рычкова М.П., Аврова Н.Ф. 2009. Роль тирозинкиназы Trk-рецепторов в реализации антиоксидантного эффекта ганглиозида в клетках РС12 Ж. эвол. биох. и физиол. 45 (5), 465.
- 31. Аврова Н.Ф., Соколова Т.В., Захарова И.О., Фураев В.В., Рычкова М.П., Власова Ю.А.2008. Нейропротекторное и метаболический эффекты микро-и наномолярных концентраций ганглиозида GM1 на клетки РС12 в условиях окислительного стресса. Нейрохимия. **25** (1), 90-98.

УДК 591.82

Вольхина И.В.1, Наумова Н.Г.2

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России¹, Санкт-Петербург ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России², Ижевск volchinaiv@gmail.com

Изменения показателей обмена биополимеров соединительной ткани при иммобилизации в тонкой кишке крыс

У стресс-реактивных крыс при иммобилизации все катаболические изменения исследуемых показателей обменов коллагена и сиаловых кислот соединительной ткани в стенке тонкой кишки более выражены, чем у стресс-устойчивых животных.

Ключевые слова: стресс, коллаген, сиаловые кислоты, тонкая кишка

Volkhina I.V.¹, Naumova N.G.²

St. Petersburg State Pediatric Medical University Ministry of Health of the Russian Federation¹, St. Petersburg Izhevsk State Medical Academy², Izhevsk

Changes in the exchange of connective tissue biopolymers during immobilization in the small intestin of rats

At rats with erosive and ulcerous damages of a wall of a stomach all catabolic changes of investigated indicators of an exchange of biopolymers of a connective tissue in a small intestine wall have been more expressed, than at animals without damages.

Key words: stress, kollogen, sialovye of acid, small intestine.

В медицинской литературе большое внимание уделяется изучению развития стрессиндуцированной патологии. Желудочно-кишечный тракт является важным звеном ассимиляции пищевых веществ, которое в значительной степени определяет общий метаболизм организма и его гомеостаз. Под влиянием стресса образуются эрозивно-язвенные повреждения слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, нарушается моторика кишечника, наблюдаются изменения всасывания жидкости, глюкозы, электролитов и повышение пассивной проницаемости тонкой кишки [4, 11]. К основным показателям стресса у животных также относятся гипертрофия коркового вещества надпочечников и, как следствие, увеличение содержания глюкокортикоидов в плазме крови.

В то же время индивидуальная устойчивость к стрессу может существенно различаться [8, 10, 12].

Коллагены являются важными структурными белками межклеточного вещества соединительной ткани. Они участвуют в поддержании водно-солевого обмена, определенной формы тканей и органов, заживлении ран, агрегации тромбоцитов, а также в воспалительных и дегенеративных процессах [3, 7].

Маркером катаболизма коллагенов является повышение уровня свободного гидроксипролина в биологических жидкостях и тканях [6].

Сиаловые кислоты (СК) входят в состав различных низко- и высокомолекулярных соединений. Степень сиалилирования гликопротеинов и гликолипидов является важным фактором молекулярного узнавания в клетке, между клетками, между клеткой и внеклеточным матриксом, а также между клеткой и некоторыми внешними патогенными факторами [1, 9]. Они могут либо маскировать сайты распознавания, либо служить детерминантами распознавания.

На поверхности эпителиальных клеток желудка и кишечника находятся муцины, являющиеся крупными высокогликозилированными гликопротеинами. На концах углеводных цепей основного секретируемого гелеобразующего муцина тонкой кишки MUC2 располагаются остатки сиаловых кислот [2].

Цель исследования. Сравнить изменения показателей стресса, обменов коллагена и сиалосодержащих соединений соединительной ткани в стенке тонкой кишки крыс с эрозивно-язвенными повреждениями слизистой желудка и у животных без повреждений при иммобилизации.

Материал и методы исследования. Исследования проводили на белых крысах-самцах в осенне-зимний период. В постановке опытов руководствовались правилами проведения работ на экспериментальных животных (приложение к приказу Министерства здравоохранения № 267 от 19.06.2003 г.).

Контрольную группу составили интактные крысы, находившиеся на обычном рационе вивария со свободным доступом к воде и корму. Испытуемых животных разделили на две группы: 1-я — с эрозивноязвенными повреждениями слизистой желудка (стресс-реактивные); 2-я — без повреждений (стресс-устойчивые).

Для моделирования стресса использовали ежедневную 3-х часовую иммобилизацию на спине в течение 8 дней. В качестве показателей стресса определяли содержание 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в плазме крови, соотношение массы надпочечников к массе тела крысы (Кн), наличие визуально видимых деструктивных повреждений стенки желудка. В стенке тонкой кишки определяли содержание свободных и белоксвязанных сиаловых кислот (ССК и БСК соответственно), а также концентрацию свободного (СО) и белоксвязанного гидроксипролина (БСО). Все изучаемые показатели исследовали на 1, 3, 5 и 8 дни опытов.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета Statistica 6.0 фирмы StatSoft.

Результаты исследования и их обсуждения. Частота эрозивно-язвенных повреждений слизистой желудка экспериментальных крыс составила 29%, 79%, 50% и 14% на 1, 3, 5 и 8-й дни иммобилизации соответственно [5].

У интактных животных в плазме крови концентрация 11-OKC составила 411 ± 10 мкг/л, Кн равнялось $0,186\pm0,019$. В стенке тонкой кишки содержание ССК соответствовало следовым количествам, уровень БСК равнялся 584 ± 12 мг/кг сухой обезжиренной ткани. Уровень СО в стенке тонкой кишки контрольных крыс составил

 $0,120\pm0,006$ г/кг сухой обезжиренной ткани, содержание БСО соответствовало $17,79\pm0,81$ г/кг сухой обезжиренной ткани.

У крыс 1-й группы при иммобилизации наблюдалось устойчивое достоверное повышение концентрации 11-ОКС на 70% (p<0,001), 127% (p<0,001), 82% (p<0,05) и 63% (p<0,05) от контрольного уровня в 1, 3, 5 и 8-й дни опытов соответственно. Масса надпочечников у животных 1-й группы увеличивалась в течение всего эксперимента, так как Кн возрастало на 9% (p>0,05), 51% (p<0,01), 27% (p>0,05) и 16% (p>0,05) в 1, 3, 5 и 8-й дни иммобилизации соответственно. Содержание ССК превышало контрольный уровень во все сроки эксперимента кроме 1-го дня на 32% (p<0,001), 34% (p<0,001) и 25% (p<0,001). Уровень БСК в 1, 3 и 5 дни опытов увеличился на 38% (p<0,05), 27% (p<0,001) и 29% (p<0,001) соответственно. Содержание СО превышало контрольный уровень во все сроки эксперимента на 39% (p<0,001), 45% (p<0,001), 38% (p<0,001), 42% (p<0,001) соответственно. Количество БСО достоверно уменьшалось у данных животных только на 3-й день эксперимента (на 20%).

У животных 2-й группы уровень 11-ОКС в 1, 3, 5 и 8-й дни иммобилизации превышал контрольный на 17%, 24%, 24% и 28% соответственно, достоверно отличаясь от контрольного уровня только на 3 день (p<0,01). У крыс этой группы изменения Кн отличались менее выраженным подъемом, не достоверным по отношению к контролю.

Содержание ССК в стенке тонкой кишки во все дни иммобилизации находилось в следовых количествах. Уровень БСК на 3-й день опытов увеличился на 36% (p<0,05). В остальные дни концентрация БСК приближалась к контролю. Содержание СО в стенке тонкой кишки превысило контрольный уровень на 3-й день иммобилизации на 23% (p<0,05), в остальные сроки экспериментов — незначительно выше контроля. Количество БСО статистически значимо не отличалось от контроля.

Различия в содержании 11-ОКС между 1-й и 2-й группами были достоверными во все дни иммобилизации: на 1, 3 и 5-й дни (p<0,001), на 8-й день — (p<0,05). Разница в Кн между 1-й и 2-й группами была достоверной на 3 день иммобилизации (p<0,001). В концентрациях ССК различия между двумя группами были достоверны на протяжении всего эксперимента (p<0,001), кроме 1-го дня. Уровни БСК достоверно отличались между двумя группами 1, 3 и 5 дни опытов. В содержании СО различия между группами были достоверны во все дни экспериментов, кроме 5-го.

Степень увеличения содержания СО и ССК, а также степень уменьшения концентрации БСО и БСК в стенке тонкой кишки от-

ражают интенсивность стрессогенных воздействий и активность процессов катаболизма биополимеров соединительной ткани.

Таким образом, иммобилизационный стресс вызывал у экспериментальных животных активацию катаболических процессов с максимумом на 3-й день опытов, что подтверждается наибольшим количеством эрозивно-язвенных повреждений слизистой желудка у экспериментальных крыс [5].

У животных с эрозивно-язвенными повреждениями стенки желудка все изменения исследуемых показателей обмена биополимеров соединительной ткани в стенке тонкой кишки были более выражены, чем у крыс без повреждений. Особенно эти различия подчеркнуты в изменениях содержания СО, ССК и БСК.

Список литературы

- 1. Corfield A. Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists // Histochem Cell Biol. 2017. 147(2). P. 119-47.
- 2. Johansson M.E., Sjövall H., Hansson G.C. The gastrointestinal mucus system in health and disease // Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013. 10(6). P. 352-61.
- 3. Querejeta R., Varo N., Lopez B., Larman M. Serum carboxyterminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease // Circulation. 2000. Vol. 101. P. 1729-1735.
- 4. Винникова С.В. Изменение мембранного пищеварения в тонкой кишке при стрессе // Вестник уральской медицинской академической науки. 2014. №3. С.184-185.
- 5. Вольхина И.В., Наумова Н.Г. Сравнительный анализ изменений показателей обмена биополимеров соединительной ткани в стеке желудка при иммобилизации у крыс с различной устойчивостью к стрессу // Вестник Удмуртского университета. 2012. Вып. 1. С.55-58.
- 6. Данилова Л.А., Чайка Н.А. Соединительные ткани: Биохимия полости рта. СПб.:Спецлит, 2016.
- 7. Данилова О.В., Бутолин Е.Г. Изменение обмена коллагена в губчатой костной ткани и плазме крови крыс при сочетании аллоксанового диабета с введением высоких доз преднизолона // Сиб. мед. журн. 2010. №1. С. 52-54.
- 8. Пермяков А.А., Елисеева Е.В., Юдицкий А.Д., Исакова Л.С. Поведенческие реакции у экспериментальных животных с различной прогностической устойчивостью к стрессу в тесте «открытое поле» // Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о Земле. 2013. вып. 3. С.83-90.

- 9. Пшежецкий А.В., Ашмарина Л.И. Десиалирование поверхностных рецепторов: новое направление в регуляции клеточных сигнальных систем // Биохимия. 2013. вып.7. Т.78, С.949-961.
- 10. Судаков, К.В. Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу. М.: Горизонт. 1998.
- 11. Сусликова М.И., Мирошниченко И.А., Корытов Л.И., Губина М.И. Закономерности изменения всасывания глюкозы в тонком кишечнике при иммобилизационном стрессе (экспериментальное исследование) // Сибирский медицинский журнал. 2010. №1. С. 36-38.
- 12. Умрюхин П.Е., Григорчук О.С. Поведение крыс в тесте открытого поля как прогностический критерий уровня кортикостерона до и после стрессорной нагрузки. //Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2015. Т. 101, №12. С. 1366-1371.

УДК 577.112.4

Воронина П.А.¹, Шмурак В.И.¹, Баталова А.А.¹, Белинская Д.А.¹, Гончаров Н.В.^{1,2} ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН¹, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России², Санкт-Петербург daria.belinskaya@iephb.ru

Влияние внутримолекулярных дисульфидных связей на ферментативную активность бычьего сывороточного альбумина в эксперименте in vitro

Впервые биохимическими методами in vitro проведена оценка влияния внутримолекулярных дисульфидных связей на взаимодействие бычьего сывороточного альбумина (БСА) с п-нитрофенилацетатом (НФА). По-казано, что разрушение S-S мостиков в молекуле БСА с помощью дитиотреитола усиливает связывающую и гидролитическую активность белка по отношению к НФА.

Ключевые слова: ферментативная активность альбумина, *n-нитрофенилацетат*, дисульфидные связи, дитиотреитол

Voronina P.A.¹, Shmurak V.I.¹, Batalova A.A.¹, Belinskaia D.A.¹, Goncharov N.V.^{1,2}

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences¹,

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology², Saint Petersburg

The effect of intramolecular disulfide bonds on the enzymatic activity of bovine serum albumin *in vitro*

For the first time, in vitro biochemical methods were used to assess the effect of intramolecular disulfide bonds on the interaction of bovine serum albumin (BSA) with p-nitrophenyl acetate (NPA). It has been shown that the destruction of S-S bridges in the BSA molecule with dithiothreitol enhances the binding and hydrolytic activity of the protein towards NPA.

Key words: enzymatic activity of albumin, p-nitrophenyl acetate, disulfide bonds, dithiothreitol

Введение. Сывороточный альбумин (CA) — это главный белок крови млекопитающих, где его концентрация составляет 500-700 мкМ. Молекула белка может связывать практически все известные лекарственные препараты и токсические вещества. Накапливаются данные и о ферментативной активности CA. Ранее с применением модельного субстрата *п*-нитрофенилацетата (НФА) было показано существование в молекуле альбумина двух разных центров, отвечающих за два вида ферментативной активности: истинно эстеразную (связывание субстрата с активным центром альбумина с последующим распадом комплекса на фермент и продукт) и псевдоэстеразную (необратимое связывание субстрата с ферментом) [1]. Предполагается, что сайт Садлоу II с каталитическим аминокислотным остатком Туг411 является первичным сайтом взаимодействия НФА с альбумином и отвечает за псевдоэстеразную активность белка, а сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Туг150 — за истинно эстеразную [2].

Молекула альбумина содержит в своей структуре 17 дисульфидных связей и одну свободную тиоловую группу в составе аминокислотного остатка Cys34, которая способна образовывать дисульфиды с низкомолекулярными тиолами или окисляться [3]. Согласно различным экспериментальным данным, взаимодействие сывороточного альбумина с низкомолекулярными тиолами затрагивает не только Cys34, но и некоторые остатки цистеина в составе дисульфидных связей [4]. Влияние модификации Cys34 и других цистеинов на функциональные свойства белка практически не изучалось. Цель представленного

исследования — на примере НФА биохимическими методами *in vitro* впервые оценить влияние внутримолекулярных дисульфидных связей на связывающую и (псевдо)эстеразную активность бычьего CA (ECA).

Методы. В работе использовали следующие реактивы и оборудование: тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma Aldrich); цистеина гидрохлорид (Sigma Aldrich); реактив Эллмана (Sigma Aldrich); дитиотреитол (ДТТ, Sigma Aldrich); свободный от жирных кислот БСА (Sigma Aldrich); реактив Бредфорда (Sigma Aldrich); мультимодальный ридер ClarioStar Plus (BMG Labtech); центрифугу СМ-50, центрифужные фильтры с отсечением масс 30кДа.

Исследовали два образца БСА: нативный и восстановленный. Раствор нативного БСА (15 мкМ) готовили на фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Для получения восстановленного БСА раствор белка в концентрации 15 мкМ смешивали с ДТТ в молярных соотношениях 1:0, 1:1000, 1:3000, 1:6000 и 1:10000, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Далее инкубационную смесь наносили на центрифужные фильтры и центрифугировали в соответствии с инструкцией. Потерю белка при центрифугировании определяли методом Бредфорда [5]. Для определения свободных тиоловых групп использовали реактив Эллмана, который вступает в реакцию с остатками цистеина. Продукт реакции, 2-нитро-5-сульфанилбензойной кислота, переходит в хиноидную форму, поглощающую свет при длине волны 412 нм [6]. Количество свободных тиоловых групп в БСА определяли с помощью калибровочного графика, построенного по известным концентрациям цистеина гидрохлорида.

Гидролитическую активность БСА (15 мкМ) по отношению к НФА определяли спектрофотометрически (405 нм) по накоплению продукта реакции нитрофенола. Ферментативную скорость рассчитывали как отношение разницы в концентрации к разнице во времени, за которое произошло это изменение. Для предстационарной фазы (кинетика сайта Садлоу II) рассчитывали скорость в диапазоне 0-90 секунд, для стационарной фазы (кинетика сайта Садлоу I) — в диапазоне 90-600 секунд. Полученные данные обрабатывали в программах MS Excel и GraphPad Prism.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе для определения свободных тиоловых групп в молекуле БСА была построена калибровочная кривая зависимости абсорбции раствора цистеина от его концентрации в инкубационной смеси. Зависимость имеет линейный характер, величина коэффициента детерминации R² составляет 0.999. Для учета потери белка при фильтрации была построена калибровочная кривая зависимости оптической плотности раствора БСА от изна-

чальной концентрации белка. Использовали растворы БСА с концентрацией 0, 0.25, 0.5 и 1 мг/мл. Зависимость имеет линейный характер, величина \mathbb{R}^2 составляет 0.994. Согласно полученным данным, потери БСА на фильтре составляют в среднем 16.2%.

На следующем шаге, для определения оптимальной концентрации восстановителя, БСА инкубировали с ДТТ в различной концентрации и с помощью полученных калибровочных кривых рассчитывали концентрацию свободных тиоловых групп в белке после инкубации (табл. 1). Как видно из таблицы, оптимальная концентрация ДТТ, при которой максимально возможное количество БСА переходит в восстановленную форму, составляет 43.5 мМ, что соответствует молярному соотношению БСА и ДТТ 1:3000.

Таблица 1. Количество свободных тиоловых групп в растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) после инкубации с дитиотреитолом (ДТТ)

ДТТ, мМ (БСА:ДТТ)	Количество свободных тиоловых групп, мкМ	Количество свободных тиоловых групп на молекулу БСА	
0 (1:0)	6,0	0,41	
14,49 (1:1000)	69,8	4,81	
43,47 (1:3000)	332,6	22,96	
86,94 (1:6000)	338,1	23,34	
144,9 (1:10000)	336,9	23,25	

Расчет количества свободных тиоловых групп в белке показал, что ДТТ может восстановить максимум 23 тиоловые группы — 11 дисульфидных связей и одну свободную тиоловую группу в составе Cys34. По всей видимости, остальные дисульфидные связи находятся в глубине белковой глобулы и недоступны для восстановителя. Интересно отметить, что на одну молекулу нативного альбумина приходится всего 0.4 свободных тиоловых групп. Это означает, что 60% молекул белка в образце БСА находится в окисленной форме, что в целом согласуется с литературными данными: в разных образцах процент альбумина с восстановленной формой Cys34 варьировал от 12.6% до 48.03% [7-9].

В заключение мы изучили кинетику взаимодействия НФА с нативным БСА и с БСА, восстановленным 3000-кратной концентрацией ДТТ. На рис. 1 и 2 представлены графики зависимости скорости гидролиза НФА от его концентрации для нативного и восстановленного БСА.

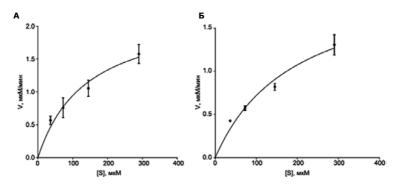


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза (V) *n*-нитрофенилацетата от его концентрации ([S]) под действием нативного бычьего альбумина. (A) Предстационарная фаза гидролиза (кинетика сайта Садлоу II). (Б) Стационарная фаза гидролиза (кинетика сайта Садлоу I)

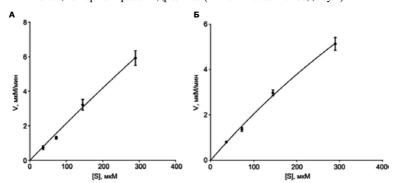


Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза (V) *n*-нитрофенилацетата от его концентрации ([S]) под действием восстановленного бычьего альбумина. (A) Предстационарная фаза гидролиза (кинетика сайта Садлоу II). (Б) Стационарная фаза гидролиза (кинетика сайта Садлоу I)

Значения константы Михаэлиса K_m и максимальной скорости V_{max} для нативного БСА рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа по модели ферментативной кинетики Михаэлис-Ментен. Для восстановленного БСА расчет максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса проводили с использованием графика Лайнуивера-Берка в двойных обратных координатах.

Согласно полученным данным (табл. 2), сродство НФА к сайту Садлоу II БСА выше, чем к сайту Садлоу I при любом состоянии белка. Аналогичный результат был получен нами ранее для параок-

сона, имеющего схожую с НФА структуру [10-11]. Функциональные свойства нативного и восстановленного БСА существенно отличаются: восстановленный белок обладает лучшим сродством и лучшей гидролитической реактивностью по отношению к НФА в обоих сайтах Садлоу.

Таблица 2. Кинетические характеристики гидролиза n-нитрофенилацетата нативным и восстановленным альбумином быка (БСА)

Образец БСА	Предстационарная фаза (кинетика сайта Садлоу II)		Стационарная фаза (кинетика сайта Садлоу I)	
	K _m , MKM	V_{max} , мк $M/$ мин	К _т , мкМ	${ m V}_{ m max}$, мк ${ m M}/{ m muh}$
Нативный	140.5	2.267	195.3	2.121
Восстановлен-	0.085	591.72	2.65	16.62

Согласно опубликованным экспериментальным и вычислительным данным, при разрушении дисульфидных связей молекула альбумина частично теряет свою вторичную и третичную структуру, белок становится более рыхлым и конформационно подвижным [12-13]. Мы полагаем, что этот процесс увеличивает доступность сайтов Садлоу, благодаря чему возрастает аффинность к НФА и скорость реакции.

Влияние дисульфидных связей на структуру и функцию ферментов широко изучается в сфере биотехнологии. Ожидаемо, S-S связи усиливают термостабильность белковых катализаторов [14-15]. Что касается активности, в ряде работ показано, что разрушение дисульфидных связей ухудшает реакционную способность ферментов [16-17]. Мы полагаем, тот факт, что активность альбумина, напротив, возрастает после разрушения S-S мостиков, можно объяснить его неспецифичностью. Активный центр классических ферментов, в отличие от альбумина, для прохождения реакции должен иметь строго определенную геометрию, и конформационные изменения в белковой глобуле критически влияют на катализ. Влияние дисульфидных связей на связывающую способность СА может иметь прикладное значение, поскольку белок активно исследуется как возможная основа наночастиц для адресной доставки лекарственных средств к нужным мишеням [18].

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290142-9 при поддержке РФФИ (проект №19-34-90026).

Список литературы

- 1. Tildon J.T, Ogilvie J.W. The esterase activity of bovine mercaptalbumin. The reaction of the protein with p-nitrophenyl acetate // J. Biol. Chem. 1972. №4. C. 1265-1271.
- 2. О ферментативной активности альбумина / Н.В. Гончаров, Д.А. Белинская, А.В. Разыграев, А.И. Уколов // Биоорг. химия. 2015. № 2. С. 131-144.
- 3. Белинская Д.А., Гончаров Н.В. Теоретические и прикладные аспекты эстеразной активности альбумина // Биоорг. химия. 2020. № 3. С. 247-260.
- 4. Nakashima F., Shibata T., Uchida K. A unique mechanism for thiolation of serum albumins by disulphide molecules // J. Biochem. 2020. №2. C. 165-171.
- 5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. C. 248-254.
- 6. Collier H.B. A note on the molar absorptivity of reduced Ellman's reagent, 3-carboxylato-4-nitrothiophenolate // Anal. Biochem. 1973. № 1. C. 310-311.
- 7. Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use / D. Bar-Or [и др.] // Crit. Care Med. 2005. №7. С. 1638-1641.
- 8. Quantitation of Oxidative Modifications of Commercial Human Albumin for Clinical Use / T. Takahashi [и др.] // Biol. Pharm. Bull. 2016. №3. С. 401-408.
- 9. Comparison of quality of human serum albumin preparations in two pharmaceutical products / H. Nakae [идр.] // Acute Med. Surg. 2017. №3. C. 251-254.
- 10. Влияние степени окисления остатка Cys34 альбумина на взаимодействие белка с параоксоном по данным молекулярного моделирования / Д.А. Белинская, М.А. Терпиловский, А.А. Баталова, Н.В. Гончаров // Биоорг. химия. 2019. № 6. С. 640-649.
- 11. Белинская Д.А., Баталова А.А., Гончаров Н.В. Влияние редоксстатуса бычьего сывороточного альбумина на его взаимодействие с параоксоном по данным молекулярного моделирования // Ж. эвол. биохим. физиол. 2020. № 5. С. 376-379.

- 12. Kella N.K., Kang Y.J., Kinsella J.E. Effect of oxidative sulfitolysis of disulfide bonds of bovine serum albumin on its structural properties: a physiochemical study // J. Protein Chem. 1988. №5. C. 535-548.
- 13. About the structural role of disulfide bridges in serum albumins: evidence from protein simulated unfolding / G. Paris, S. Kraszewski, C. Ramseyer, M. Enescu // Biopolymers. 2012. №11. C. 889-898.
- 14. Contribution of Disulfide Bridges to the Thermostability of a Type A Feruloyl Esterase from Aspergillus usamii / X. Yin [и др.] // PLoS One. 2015. №5. e0126864.
- 15. Rational Design of Disulfide Bonds Increases Thermostability of a Mesophilic 1,3-1,4-β-Glucanase from Bacillus terquilensis / C. Niu, L. Zhu, X. Xu, Q. Li // PLoS One. 2016. №4. e0154036.
- 16. Role of disulfide bridges in the activity and stability of a cold-active alpha-amylase / K.S. Siddiqui // J. Bacteriol. 2005. №17. C. 6206-6212.
- 17. Elimination of a Free Cysteine by Creation of a Disulfide Bond Increases the Activity and Stability of Candida boidinii Formate Dehydrogenase / J. Zheng // Appl. Environ. Microbiol. 2016. №2. e02624-16.
- 18. Chitosan coated human serum albumin nanoparticles: A promising strategy for nose-to-brain drug delivery / V. Piazzini // Int. J. Biol. Macromol. 2019. C. 267-280.

УДК (616.89-008.454:612.017)-07

Дубинина Е.Е.¹, Щедрина Л.В.²

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им В.М Бехтерева Минздрава России, Санкт-Петербург eedubinina@rambler.ru¹, petrored@bekhterev.ru²

Роль активных форм кислорода в регуляции клеточных сигнальных путей в норме и при патологии

В работе обобщены литературные и собственные данные о роли активных форм кислорода в качестве вторичных мессенджеров в регуляции функциональной активности клеток. Отражена тесная взаимосвязь между функционированием первичных и вторичных мессенджеров в трансформации сигнала извне. Активные формы кислорода в качестве вторичных мессенджеров активно включаются в сигнальную трансдукцию, влияя на ключевые звенья метаболических процессов, которые мы рассматриваем как третичное звено передачи сигнала в клетке, обеспечивающее включение механизмов адаптапции

при стрессорных воздействиях. Нарушение системы адаптации организма лежит в основе многих патологических состояний, в том числе и нейродегенеративных.

Ключевые слова: активные формы кислорода, первичные и вторичные мессенджеры, окислительный стресс.

Dubinina E.E., Shedrina L.V.

Federal State Budgetary Institution Saint- Petersburg Research Psychoneurological institute named after V. M. Bekhterev of Minzdrav of Russia

The role of reactive oxygen species in the regulation of cellular signaling pathways in health and disease

The work summarizes the literature and our own data on the role of reactive oxygen species as secondary messengers in the regulation of the functional activity of cells. The close relationship between the functioning of primary and secondary messengers in signal transformation from the outside is reflected. Reactive oxygen species as secondary messengers are actively involved in signal transduction, influencing the key links of metabolic processes, which we consider as a tertiary link in signal transduction in the cell, ensuring the inclusion of adaptation mechanisms under stressful influences. Violation of the body's adaptation system underlies many pathological conditions, including neurodegenerative ones.

Key words: reactive oxygen species, primary and secondary messengers, oxidative stress.

Метаболический фон любой клетки зависит от характера информации, поступающей из окружающей внешней и внутренней сред организма. Любая стрессорная ситуация независимо от ее интенсивности и длительности сопровождается включением системы адаптации организма. В норме при стрессорных состояниях наблюдается мобилизация механизмов адаптации организма, включающих окислительно-восстановительый статус, гормональные и иммунно-воспалительные процессы, которые тесно связаны между собой. Все это приводит к перестройке метаболического фона организма за счет интенсивного устранения поврежденных молекул, быстрого обновления химического состава клеток и восстановления нарушенного сбалансированного равновесия между процессами пролиферации и апоптоза. Это в свою очередь является предпосылкой выживания и нормального существования организма в меняющейся обстановке [1].

Жизнедеятельность клеток в организме обеспечивается за счет включения и регуляции сигнальных путей. Любая информация, поступающая извне или изнутри клеток, в основном, носит химический характер и представлена нейротрансмиттерами, цитокинами, гормонами, факторами роста нейротрофинами и другими стимулами. Все эти соединения относятся к группе первичных мессенджеров. Взаимодействие их с соответствующими рецепторами приводит к трансформации сигнала через ряд метаболических мессенджеров, участвующих в регуляции сигнальных путей.

На уровне клетки это обеспечивается за счет поэтапной передачи сигналов за счет взаимодействия первичных мессенджеров с определенными рецепторами клеточных мембран. Образование лиганд-рецепторных комплексов сопровождается генерацией вторичных мессенджеров [2, 3].

При поступлении сигнала рецептор фактически функционирует как транспортный передатчик информации через различные трансдукторы (transducer) и усилители (amplifier), которые участвуют в образовании внутриклеточных, вторичных мессенджеров. В качестве вторичных мессенджеров выступают активные формы кислорода (АФК), продукты пероксидации липидов (ПОЛ), циклические аденозинмонофосфат (ц $AM\Phi$) и гуанозинмонофосфат (ц $\Gamma M\Phi$), Ca^{++} , $NO\cdot$, продукты распада фосфолипидов: диацилглицерол, инозит-1,4,5трифосфат, арахидоновая кислота и др. Вторичные мессенджеры ответственны за передачу информации сенсорам (sensors), которые в свою очередь передают ее эффекторам. Через сенсоры и эффекторы вторичные мессенджеры активно включаются в сигнальную трансдукцию, влияя на ключевые звенья метаболических процессов, которые можно охарактеризовать как третичное звено передачи сигнала в клетке [4]. Это осуществляется через различные информационные транспортные механизмы, такие как прямое белок-белок взаимодействие или фосфорилирование/дефосфорилирование, ацетилирование и нитрозилирование белков, регуляция метаболизма Са⁺⁺, активация факторов транскрипции и гидролиз фосфолипидов. В целом, весь этот каскад клеточных сигнальных путей взаимодействий приводит к определенному физиологическому ответу, связанному с процессами пролиферации, дифференцировки, апоптоза, клеточной адгезии, свертывания крови и др.

Действие АФК на функцию клеток в качестве вторичного мессенджера осуществляется за счет низких концентраций, которые для H_2O_2 колеблются в пределах от 1 до 50 мкмоль, не оказывая поврежлающего действия [5].

Но этот уровень H_2O_2 может широко варьировать в зависимости от функции ткани, состояния ее антиоксидантной защиты (AO3). Мозговая ткань в силу высокой зависимости ее метаболических процессов от степени насыщенности кислородом, высокого уровня полиненасыщенных жирных кислот, определенных функциональных особенностей обладает высокой чувствительностью к окислительному стрессу (OC).

Передача внешних сигнальных стимулов с участием рецепторов фактора роста, в том числе и нейротрофинов, гормонов и цитокиновых рецепторов, сопряжена с генерацией $A\Phi K$ за счет активации NADPHоксидазы, называемой Nox1, в отличие от NADPH-оксидазы фагоцитов $(Nox\ 2)\ [6,\ 7]$.

Источником электронов является NADPH, что сопровождается образованием O_2^- . Физиологический уровень АФК поддерживается за счет сбалансированного соотношения прооксидатной (ПОС) и антиоксидантной (АОС) в организме.

При анализе действия АФК обращает на себя внимание их разнонаправленный характер, связанный, с одной стороны, с регуляцией пролиферации, с другой с регуляцией апоптоза. Такое разностороннее действие АФК при стрессорных воздействиях обусловлено перестройкой организма к изменившимся условиям окружающей среды за счет интенсивного устранения поврежденных молекул и быстрого обновления химического состава клеток. Это является предпосылкой выживания и нормального существования организма в меняющейся обстановке, сопровождающейся восстановлением нарушенного сбалансированного равновесия между процессами пролиферации и апоптоза. При патологических состояниях нарушение этого синхронного действия в сторону пролиферации может привести к развитию опухолевых процессов, а усиление апоптоза и снижение пролиферации — к нейродегенеративным процессам.

Анализируя роль AФК с позиции вторичных мессенджеров при передаче сигнала, можно условно выделить два аспекта их действия: во-первых, влияние на структурную организацию мембран и, в частности, на функцинирование рецепторного аппарата, во-вторых, на функциональную активность клеток, при непосредственном участии в регуляции процессов пролиферации и апоптоза.

С метаболизмом АФК связывают изменения подвижности, текучести и деполяризации мембран. Изменение фазового состояния липидов in vivo может быть связано с их пероксидацией, что является причиной перехода липидов в жидкокристаллическое состояние. А это, в свою очередь, приводит к изменению конформации белков

и, соответственно, к изменению проницаемости клеточных мембран, функции ионных каналов и насосов, а также рецепторов. Вероятно, в норме ПОЛ может играть роль одного из инициирующих факторов в передаче сигнала при образовании лиганд-рецепторного комплекса и последующего его устранения.

По всей вероягности, именно физиологические концентрация АФК через их влияние на конформационное состояние липиднобелкового слоя мембран, могут оказывать регулирующее действие на процесс «down-regulation» рецепторов, который обеспечивает своевременное устранение активного лиганд-рецепторного комплекса с клеточной поверхности с последующей его деградацией [2, 8]. При патологических состояниях в условиях ОС в противоположность этому процессу возможна активация рецептора за счет H_2O_2 , что обеспечивает пролонгированный рецепторный ответ. Показано, что Н₂О₂ стимулирует процессы фосфорилирования тирозиновых остатков рецептора, что тормозит его убиктинизацию и эндоцитоз. Активация рецептора за счет АФК происходит без включения «down-regulation», что может приводить к интенсификации пролиферации и развитию опухолевых процессов. Не исключена возможность, что модификация тирозиновых остатков может осуществляться не за счет процессов фосфорилирования, а за счет их нитрования (nitration) [9].

Важным звеном в проявлении функциональной активности АФК отводят процессам фосфорилирования/дефосфорилирования белковых молекул. Известно, что большая группа белков, включающих ферменты, рецепторы, факторы транскрипции, сократительные белки, могут активироваться или инактивироваться за счет фосфорилирования аминокислотных остатков. Уровень фосфорилирования внутри клетки определяется балансом между активностью протеинкиназ и протеинфосфатаз. При изучении процессов фосфорилировании/дефосфорилирования тирозиновых остатков белков показано, что оксиданты. активируют протеинтирозинкиназы и ингибируют протеинтирозинфосфатазы [10, 11]. Оксиданты принимают активное участие в регуляции генной экспрессии в качестве вторичных мессенджеров, активируя ряд факторов транскрипции АР-1, NF-кВ, Муь, Ets, ATF2 и др. Влияние оксидантов на процессы активации факторов транскрипции AP-1 и NF-иВ связаны с процессами фосфорилирования белков и состоянием редокс-статуса клетки [12 - 14].

В настоящее время известно, что оксиданты и антиоксиданты могут непосредственно модулировать редокс-статус цистеиновых остатков факторов транскрипции.

Таким образом, влияние АФК в качестве вторичного мессенджера на узловые звенья сигнальных каскадов осуществляется через регуляцию активности факторов транскрипции, процессы фосфорилирования/дефосфорилирования, обмена фосфоинозитолфосфатов, метаболизма Са++. Действие АФК сопряжено с двумя сигнальными каскадами: фосфатидилинозитол 3-киназа PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase) — Akt (v-akt murinethymomaviral oncogene homologue), известный как протеинкиназа В и митогенактивированная протеинкиназа ERK 1/2(extracellular signal-regulated kinase) кinase) сигнальный каскад [15, 16].

Сигнальная трансдукция МАРкиназного каскада, включающего внеклеточные регулирующие киназы 1 и 2 (ERK 1/2), в настоящее время рассматривается как один из основных путей действия АФК в качестве вторичных мессенджеров [17].

Следует отметить, что генерация АФК и их роль в процессах внутриклеточной сигнализации в физиологических условиях далека от разрешения. Полученные данные противоречивы и неоднозначны. Фактически в ряде исследований показано, что про- и антиоксиданты могут влиять на общие сигнальные трансдукционные пути или дифференциально модулировать отдельные звенья сигнальных каскадов, например, связанных с вовлечением факторов роста, Соответственно, антиоксиданты, защищая ткани от токсического действия АФК, параллельно ингибируют проявление физиологического эффекта последних. Только комплексный подход с учетом специфики и особенности функционирования клеток, исследования на уровне генома позволят с новых позиций оценить роль АФК в механизмах регуляции функции клеток.

Список литературы

- 1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение) // Санкт-Петербург: Медицинская пресса, 2006. 400 с.
- 2. Berridge M.J. Cell Signaling Biology // 2012. Introduction. Modul 1. doi:10.1042/csb0001001
- 3. Berridge M.J. Cell Signaling Biology // 2012. Cell signalling pathway. Modul 2. doi:10.1042/csb0001002

- 4. Дубинина Е.Е., Щедрина Л.В., Мазо Г.Э. Основные биохимические аспекты патогенеза депрессии. Часть I // Успехи физиологических наук. 2018. N 1. C. 28.
- 5. Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. Free Radic. Biol. Med. 1997. V.22. N1/2. P.269-285.
- 6. Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. Biochem. Soc. Trans. 2001. V.29. (Pt 2). P.345-350.
- 7. Sorescu D., Weiss D., Lassegue B., et all. Superoxide production and expression of Nox family proteins in human atherosclerosis. Circulation. 2002. V.105. N12. P.1429-1435.
- 8. Ravid T., Sweeney C., Gee P., et all. Epidermal growth factor receptor activation under oxidative stress fails to promote c-Cbl mediated down-regulation. J. Biol. Chem. 2002. V.277. N34. P.31214-31219.
- 9. Monteiro H.P. Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? Free Radic. Biol. Med. 2002. V.33. N6. P.765-773.
- 10. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell. 1995. V.80. N2. P.225-236.
- 11. Lee K., Esselman W.J. Inhibition of PTPs by H_2O_2 regulates the activation of distinct MAPK pathways. Free Radic. Biol. Med. 2002. V.33. N8. P.1121-1132.
- 12 Allen R.G., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. Free Radic, Biol. Med. 2000, V.28, N3, P.463-499.
- 13. Bowie A.G., O'Neill L.A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. Biochem. Pharnacol. 2000. V.59. N1. P.13-23.
- 14. Michiels C., Minet E., Mottet D., Raes M. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kB and HIF-1, two extremes. Free Radic. Biol. Med. 2002. V.33. N9. P.1231-1242.
- 15. Kuruvilla R.,Ye H., Ginty D.D. Spatially and functionally district roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons // Neuron. 2000. V. 27. P. 499.
- 16. Watson F.L. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response // Nature Neurosci. 2001. V. 4. P. 981.
- 17. Poynter M.E., Janssen-Heininger Y.M., et all. Measurement of oxidant-induced signal transduction proteins using cell imaging. Free Radic. Biol. Med. 1999. V.27. N11/12. P.1164-1172.

УДК 577.15.08

Жукова О.Ю.¹, Богданчикова П.В.², Цвяк М.А.³, Конышева А.А.⁴ ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет, Омск booto@list.ru¹, polinabogd2000@yandex.ru², m.tsviak@yandex.ru³, 164046085@list.ru⁴

Влияние состава среды выделения при получении гомогенатов тканей животных на активность супероксиддисмутазы и каталазы

В работе представлены результаты спектрофотометрического исследования активности супероксиддисмутазы и каталазы в гомогенатах, приготовленных с использованием разных сред выделения (фосфатного буфера и хлорида калия). Установлено, что при исследовании активности СОД гомогенаты предпочтительно готовить на фосфатном буферном растворе, для определения активности каталазы на растворе хлорида калия.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, каталаза, гомогенат, фосфатный буфер, хлорид калия, ткани животных, метод.

Zhukova O.Ju., Bogdanchikova P.V., Cvyak M.A., Konisheva A.A. Omsk State Medical University, Omsk

Influence of the extraction solution composition in animal tissues homogenates on superoxide dismutase and catalase activitys

The superoxide dismutase and catalase activitys in animal tissues (liver) was researched by spectrophotometry depending on using extraction solution in making homogenates (phosphate buffer or solution of potassium chloride). It was found that for determine activity of SOD it is better to use the homogenates with a phosphate buffer and for determine the activity of catalase — a solution of potassium chloride.

Key words: superoxide dismutase, catalase, homogenate, phosphate buffer, potassium chloride, animal tissues, method.

Во многих биохимических экспериментах выполняются одни и те же процедуры. Большинству биохимических исследований органов и тканей животных предшествует этап приготовления гомогенатов с использованием сред выделения, компоненты которых могут влиять на ход специфических методов анализа. И хотя методики приготовления гомогенатов стандартны и, как правило, отработаны, в практике может возникнуть необходимость использования одного гомогената для определения нескольких показателей, а также эконо-

мическая целесообразность использования другой среды выделения в связи с изменением условий материального обеспечения научных исследований. Перед исследователями стоит актуальная задача оценки эквивалентности данных, полученных разными методиками или их модификациями. При получении гомогенатов тканей животных в качестве среды выделения наиболее часто используют сахарозный буфер [1], рекомендуемый для приготовления гомогенатов большинства тканей, и в том числе печени. Кроме того, в литературе можно встретить варианты с раствором хлорида калия [3,4] и фосфатным буфером [9] в качестве среды выделения при гомогенизации животных тканей. Одни и те же показатели, в частности активность супероксиддисмутазы и каталазы, определяются разными исследователями в гомогенатах, приготовленных на основе разных сред.

Цель исследования. Сравнить эквивалентность сред выделения на основе хлорида калия и фосфатного буфера для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в тканях животных.

Материалы и методы исследования. Исследовали активность СОД по ингибированию реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде по Т.В.Сирота [5]. Активность каталазы по методу М.А. Королюка [8] спектрофотометрически в 10% гомогенате куриной печени. Готовили два вида гомогенатов: с использованием 0,15 М раствора хлорида калия (рH=7) и 50 мМ фосфатного буферного раствора (рH=7). В гомогенатах также определяли содержание общего белка биуретовым методом. Проводили две серии измерений по 10 проб. Для статистического сравнения двух методов приготовления гомогенатов применяли непарный t-тест.

Результаты и их обсуждение.

Активность супероксиддисмутазы. Для определения активности СОД выбирали интервал времени, на котором наиболее заметно торможение окисления адреналина -90-120 сек.

При использовании в качестве среды выделения фосфатного буферного раствора активность СОД составила $4,64\pm1,55$ Ед/г белка, в растворе хлорида калия $-3,86\pm2,23$ Ед/г белка.

Активность каталазы. Каталаза проявляла более высокую активность в среде выделения на основе хлорида калия — $(2,67\pm0,02)\times10^6$ мкат/г белка. В фосфатном буфере активность каталазы — $(2,00\pm0,05)\times10^6$ мка.

Концентрация белка. В гомогенатах, приготовленных на основе фосфатного буфера, концентрация белка была выше на 19,8%.

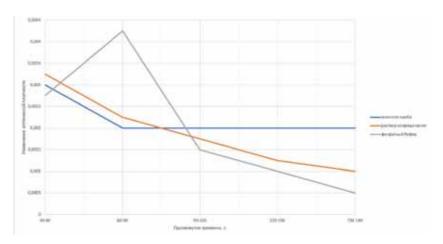


Рис. 1. Динамика торможения реакции аутоокисления адреналина в гомогенатах печени, ед. оптической плотности

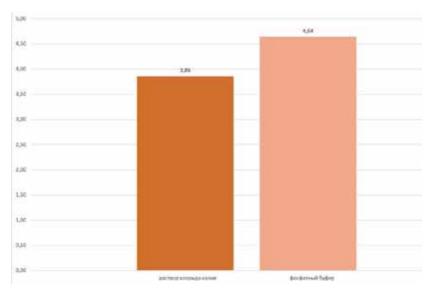


Рис. 2. Активность СОД в гомогенатах печени, Ед/г белка

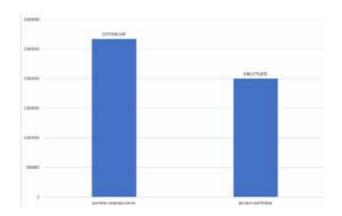


Рис. 3. Активность каталазы в гомогенатах печени, мкат/г белка

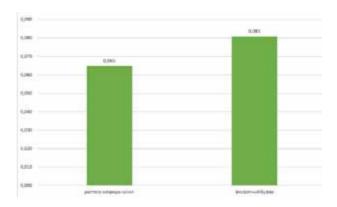


Рис. 4. Концентрация белка в гомогенатах печени, г

При осуществлении количественного биохимического анализа часто возникает необходимость сравнить два альтернативных метода, чтобы понять, дают ли они одинаковый результат. Для этого пользуются t-тестом Стьюдента. t-тест определяет, насколько перекрываются два набора данных. Чем меньше расчетное значение t ($t_{\text{расч}}$), тем больше область совпадающих значений. Способ расчета t расч. зависит от того, совпадают ли стандартные отклонения для двух наборов данных. Для этого проводится F-тест. F-тест основан на нулевой гипотезе, постулирующей отсутствие различий в дисперсиях двух наборов данных. В соответствии с этим тестом рассчитывают F(F) — отноше-

ние большей из двух дисперсий к меньшей, значение сравнивается с табличным. Критическое значение F (критерий Фишера) при доверительной вероятности 95% и числе степеней свободы для каждого метода 9 в нашем исследовании не менее 3,14. Если расчетное значение критерия Фишера меньше табличного, то нулевая гипотеза считается верной и два стандартных отклонения признаются равными. Значение t расч. также сравнивается с табличным. При доверительной вероятности 95% и числу степеней свободы, равной 18 для нашего эксперимента критическое значение t не менее 2,086 [7].

Для СОД получили F = 5,13. Значение критерия Фишера выше критического, поэтому для расчета t использовали формулу:

$$t_{\text{pac}_{4}} = \frac{\overline{x}_{1} - \overline{x}_{2}}{\sqrt{({s_{1}}^{2}/n_{1}) + ({s_{2}}^{2}/n_{2})}}$$

здесь \bar{x}_1 и \bar{x}_2 —рассчитанные средние значения для двух наборов данных, s_1^2 и s_2^2 — стандартные отклонения для двух наборов данных, и — число экспериментальных точек в каждом наборе. $t_{\text{расч}}$ для СОД = 0,68. Это означает, что методы определения активности СОД с использованием фосфатного буферного раствора и раствора хлорида калия при доверительной вероятности 95% дают одинаковый результат.

Для каталазы F=11,12, $t_{\rm pacq}=2,7$. С учетом t-теста, методы определения активности каталазы с использованием фосфатного буферного раствора и раствора хлорида калия нельзя считать одинаковыми.

Для концентрации белка $F_{\text{расч}}=1,3$, что меньше критического, поэтому дисперсии двух методов можно считать одинаковыми и для критерия t применяются другие формулы:

$$t_{
m pac4} = rac{\overline{\mathrm{x}}_1 - \overline{\mathrm{x}}_2}{S_{
m o 6 m}} \sqrt{rac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$S_{\text{общ}} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Для концентрации белка $t_{\rm pacy}=5,3$, следовательно, методы определения количества белка в гомогенате с использованием фосфатного буферного раствора и раствора хлорида калия также нельзя считать одинаковыми. Фосфатный буфер эффективнее раствора хлорида калия как среда выделения на 19,8%. Каталаза проявляет более высокую активность в среде выделения на основе хлорида калия, что обусловлено интенсивной реакцией фосфатов с молибдатом или парамолибдатом аммония, применяемого в методе Королюка [2]. Таким образом, фосфатный буфер не рекомендуется использовать при исследовании каталазы. Данное обстоятельство позволяет критически относиться к некоторым результатам [6], а также диктует необходимость выбирать другие среды для гомогенизации, искать варианты снижения чувствительности молибдата к ионам $\mathbb{P0}_4^{3-}$ [2].

Фосфатный буфер эффективнее раствора хлорида калия как среда выделения, поэтому может быть использован для получения гомогената из животных тканей при исследовании активности СОД, но не каталазы.

- 1. Graham J.M. Homogenization of mammalian tissues// TheScientificWorldJOURNAL. 2002. 2. pp. 1626–1629.
- 2. Величко А.К., Соловьев В.Б, Генгин М.Т. Методы лабораторного определения общей перекись разрушающей активности ферментов растений// Известия ПГПУ им. В.Г. белинского. 2009. № 14 (18). С. 44-48.
- 3. Герунов Т.В., Чигринский Е.А., Герунов В.И., Конвай В.Д. Морфобиохимическая оценка повреждения почек у крыс при острой интоксикации Дельтаметрином// Вестник АПК Ставрополя. 2015. Спецвыпуск №1. С. 44-48.
- 4. Корнякова В.В., Конвай В.Д. Роль нарушения метаболизмов пуринов в повреждении кардиомиоцитов крыс при физических нагрузках// Омский научный вестник. 2012. №1. С. 96-99.
- 5. Сирота Т.В.. Стандартизация и регуляция скорости супероксидгенерирующей реакции автоокисления адреналина, используемой для определения про/антиоксидантных свойств различных материалов// Биомедицинская химия. 2016. Том 62, выпуск 6. С. 650-655.
- 6. Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Бородина, А.В., Головина И.В. Качественный состав каротиноидов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в тканях двустворчатого моллюска Anadara Inaequivalvis// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2013. Т. 49, №4. С. 255-263.

- 7. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии [Электронный ресурс] / ред. К. Уилсон и Дж. Уолкер; пер. с англ.— 2-е изд. (эл.).—Электрон. текстовые дан.(1 файл pdf: 855 с.).—М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.—(Методы в биологии).— Систем. требования: Adobe Reader XI; экран 10».
- 8. Черданцев Д.В., Винник Ю.С., Каспаров Э.В. Диагностика и лечение окислительного стресса при остром панкреатите. Новосибирск, 2002. 147с.
- 9. Эмирбеков Э.З., Магомедова Н.Г., Мирская Р.О., Мейланов И.С. Исследование активности каталазы в тканях лягушки озерной Rana ridibunda при гипотермии и самосогревании// Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Приложение. 2004. №6, С. 55-60.

УДК 612.015.1:611.814.1-018.82]-092.9

Заерко А.В.¹, Федина Е.М.², Зиматкин С.М.³, Валько Н.А.⁴

Гродненский государственный медицинский университет Гродно, Беларусь wersall_91@mail.ru¹, phedina.katerina@mail.ru², smzimatkin@mail.ru³, sumeresto@gmail.com⁴

Иммунореактивность NeuN, нейроглобина и ATФ-синтазы в развивающихся гистаминергических нейронах гипоталамуса крысы

Цель исследования — оценка содержания NeuN, Ngb и ATФ-синтазы в гистаминергических нейронах мозга крыс в динамике постнатального онтогенеза. Исследование выполнено на 5-, 10-, 20-, 45- и 90-суточных беспородных белых крысах. Установлено, что в ходе постнатального развития гистаминергических нейронов происходит синхронное возрастание иммунореактивности NeuN, Ngb и ATФ-синтазы.

Ключевые слова: гистаминергические нейроны, NeuN, Ngb, ATФ-синтаза, постнатальное развитие.

Zaerko A.V., Phedina K.M., Zimatkin S.M., Valko N.A. Grodno State Medical University Grodno, Belarus

Immunoractivity of NeuN, neuroglobin and ATP synthase in developing histaminergic neurons of the rat hypthalamus

The aim of the research work is content assessment of NeuN, Ngb, and ATP synthase in histaminergic neurons of rat brain in the postnatal ontogenesis

dynamics. The study was performed on 5-, 10-, 20-, 45- and 90-day old outbred white rats. During the postnatal development of histaminergic neurons a simultaneous increase in the immunoreactivity of NeuN, Ngb and ATP synthase occurs.

Key words: histaminergic neurons, NeuN, Ngb, ATP synthase, postnatal development.

Введение. В последние десятилетия для изучения развития нейронов в постнатальном онтогенезе активно используются молекулярные маркеры, которые позволяют не только определять морфологические особенности созревания клеток, но и получать сведения об их дифференцировке и функциональном состоянии.

Так, белок NeuN (neuronal nuclei) — маркер зрелых нейроцитов — активно используется в иммуногистохимических исследованиях как универсальный нейроспецифический маркер при изучении дифференцировки нейронов [1]. Нейроглобин (Ngb) — железосодержащий белок, который служит для депонирования и транспорта кислорода к митохондриям нейронов, тем самым способствуя поддержанию кислородного гомеостаза мозга [3], а также влияет на некоторые метаболические пути, включая поддержание ионного гомеостаза, энергетического метаболизма и передачу клеточных сигналов [9]. АТФсинтаза — интегральный белок внутренней мембраны митохондрий. Он расположен в непосредственной близости к дыхательной цепи и обозначается как V комплекс, осуществляющий реакцию синтеза АТФ из АДФ [2].

Одной из наиболее важных нейротрансмиттерных систем головного мозга является гистаминергическая. Тела гистаминергических нейронов в головном мозге взрослых позвоночных ограничены туберомаммиллярной областью заднего гипоталамуса, Гистаминергическая система устроена по «древовидному» принципу: небольшое количество крупноклеточных нейронов (в мозге крысы — лишь 3—4 тысячи, в мозге человека — 64 тысячи) иннервируют миллиарды клеток коры и подкорковых структур и таким образом участвуют в регуляции многих функций ЦНС [4].

Представляет значительный интерес изучение иммунореактивности перечисленных выше молекулярных маркёров в развивающихся гистаминергических нейронах, поскольку в мировой литературе данные о подобных исследованиях отсутствуют.

Цель исследования: оценка содержания NeuN, нейроглобина и ATФ-синтазы в гистаминергических нейронах мозга крыс в динами-ке постнатального онтогенеза.

Материал и методы исследования. Исследование выполнено на потомстве беспородных белых крыс (всего 15 крысят). Декапитацию крысят осуществляли на 5-е, 10-е, 20-е, 45-е и 90-е сутки после рождения, быстро извлекали головной мозг, вырезали гипоталамус. Образцы гипоталамуса фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [6] при $+4^{\circ}$ С (на ночь), затем заключали в парафин и изготавливали парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Препараты обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии, исключающей процедуру теплового демаскирования антигенов [7].

С целью оценки созревания гистаминергических нейронов, в гипоталамусе определяли нейрональный ядерный белок NeuN (маркер зрелых нейронов) [1]. Для иммуногистохимического выявления NeuN применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания) — ab.128886 (в разведении 1:400, при +4°C, 20 ч., во влажной камере). Для выявления связавшихся первичных антител использовали: набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit ab.80437 Abcam (Великобритания).

Для иммуногистохимического выявления нейроглобина — белка, вовлеченного в поддержание газового гомеостаза клетки [3], применяли первичные моноклональные мышиные антитела Anti-Ngb antibody фирмы Abcam (Великобритания, аb. 14748) в разведении 1:600 при $+4^{\circ}$ С, экспозиция 20 ч, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Для определения иммунореактивности молекулярного маркёра митохондрий АТФ-синтазы (комплекса V, образующего АТФ из АДФ) [2], применяли первичные моноклональные мышиные антитела Anti-ATP5A antibody фирмы Abcam (Великобритания, аb. 14748) в разведении 1:2400 при $+4^{\circ}$ С, экспозиция 20 ч, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, аb. 80436).

Гистологические препараты изучали, фотографировали и анализировали с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), встроенной цифровой видеокамеры Leica (DFC 320, Германия), а также программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). Цитофотометрическое исследование иммуногистохимических препаратов проводили, определяя оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме гистаминергиче-

ских нейронов, на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакций.

Полученные данные обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна—Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test).

Результаты и их обсуждение. С 5-х по 90-е сутки постнатального развития крыс содержание всех изученных молекулярных маркёров в гистаминергичских нейронах значительно возрастает. Они располагаются в виде мелкой зернистости преимущественно в цитоплазме перикарионов, не выявляются в ядрах нейронов и их мало в нейропиле, между телами нейроцитов. Отчётливо прослеживается увеличение размеров гистаминергических нейронов и увеличение содержания изученных молекулярных маркёров в их цитоплазме в постнатальном онтогенезе.

Иммунореактивность ядерного белка NeuN (маркер зрелых нейроцитов) в гистаминергических нейронах гипоталамуса с 5-х по 90-е сутки постнатального развития возрастает в 1,4 раза (p<0,001). Так, в интервалах с 5-х по 10-е сутки, с 10-х по 20-е и с 20-х по 45-е сутки иммунореактивность данного маркера увеличивается в 1,1 раза, а с 45-х по 90-е сутки не претерпевает значительных изменений.

Экспрессия Ngb (белок, вовлеченный в поддержание кислородного гомеостаза клетки) с 5-х по 90-е сутки постнатального развития в гистаминергических нейронах мозга крыс возрастает в 1,6 раза (p<0,001). При этом с 5-х по 10-е сутки иммунореактивность данного маркера увеличивается в 1,2 раза, с 10-х по 20-е сутки — в 1,1 раза, с 20-х по 45-е сутки — в 1,2 раза, а с 45-х по 90-е сутки существенно не меняется.

Иммунореактивность маркера митохондрий АТФ-синтазы в гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс с 5-х по 90-е сутки постнатального развития возрастает в 1,5 раза. При этом с 5-х по 10-е сутки, с 20-х по 45-е и с 45-х по 90-е сутки иммунореактивность данного маркера увеличивается в 1,1 раза, а с 10-х по 20-е сутки не претерпевает существенных изменений.

Постепенно нарастающая иммунореактивность белка NeuN (маркера дифференцирующихся нервных клеток) в цитоплазме гистаминергических нейронов вплоть до 45-х суток постнатального онтогенеза, свидетельствует о том, что после рождения животных дифференцировка гистаминергических нейронов активно продолжается. Высокий уровень экспрессии NeuN сохраняется в исследованных нейроцитах и на 90-е сутки. Согласно литературным данным, экс-

прессия NeuN выявляется в течение всей жизни нейрона. Следует отметить, что присутствие данного белка исключительно в нейронах, его преимущественно внутриядерная локализация и способность связываться с PHK позволили ученым высказать предположение об участии NeuN в процессах нейронспецифического сплайсинга премРНК. Косвенным подтверждением его функционирования как регулятора сплайсинга является концентрирование данного белка в составе ядерных спеклов (ядерных телец, состоящих из интерхроматиновых гранул), которые являются местами хранения и модификации факторов сплайсинга. Предполагается участие NeuN в процессинге первичной микроРНК. Присутствие NeuN в течение всей жизни нейрона, в свою очередь, указывает на роль этого белка как постоянного регулятора общих проявлений нейронального фенотипа, т. е. специфических признаков нейронов [1].

В растущей и развивающейся клетке происходит усиленный синтез пластических веществ, сопровождающийся активацией окислительных процессов и, соответственно, увеличением потребности клеток в кислороде. Поскольку нейроглобин служит для депонирования и переноса кислорода к митохондриям нейронов с целью обеспечения функционирования системы окислительного фосфорилирования [3], вполне закономерным является его возрастающая иммунореактивность в гистаминергических нейронах с 5-х по 90-е сутки постнатального развития крыс. Предполагается, что белок нейроглобин должен концентрироваться в цитоплазматических компартментах, где непосредственно происходят окислительные процессы [5]. Следовательно, наиболее вероятна его локализация в митохондриях или вблизи этих органелл. Проведённые Lechauve и соавторами биохимические исследования указывают на присутствие нейроглобина в составе именно митохондриальной фракции [8]. Однако данные о совместном расположении этого белка и митохондриальных маркеров пока не получены, поэтому можно предположить, что нейроглобин локализуется только в части митохондрий нервных клеток.

Активно дифференцирующиеся гистаминергические нейроны нуждаются в значительном количестве энергии, запасаемой в макроэргических связях АТФ, синтез которой является одной из основных функций митохондрий. Митохондриальная мембранная АТФ-синтаза продуцирует АТФ из АДФ с помощью трансмембранного градиента протонов, который генерируется электрон-транспортными комплексами дыхательной цепи. Энергия трансмембранного градиента используется для синтеза АТФ и для активного транс-

порта необходимых субстратов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Сочетание этих реакций обеспечивает эффективный обмен АТФ-АДФ между митохондрией и цитозолем, что позволяет поддерживать в клетке высокий уровень энергообеспечения. Во время дифференцировки клеток АТФ-синтаза также способствует формированию крист митохондрий [2]. Поэтому возрастание иммунореактивности АТФ-синтазы с 5-х по 90-е сутки постнатального развития гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс отражает закономерности становления энергетического аппарата этих клеток.

Заключение. В период постнатального развития гистаминергических нейронов ядра Е2 гипоталамуса, с 5-х по 90-е сутки после рождения, параллельно структурному и метаболическому становлению этих нейронов, в их цитоплазме происходит синхронное возрастание иммунореактивности маркера дифференцирующихся нервных клеток — NeuN, белка, вовлеченного в поддержание газового гомеостаза клетки, — нейроглобина и молекулярного маркёра митохондрий — АТФ-синтазы.

- 1. Перспективы использования ядерного белка NeuN в качестве показателя функционального состояния нервных клеток у позвоночных / О.С. Алексеева, В.В. Гусельникова, Г.В. Безнин [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. -2015. -T. 51, № 5. -C. 313—323.
- 2. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Роль митохондрий в энергетике клетки и характеризующие ее молекулярные маркеры // Оренбургский медицинский вестник. -2019. T.7, № 1 (25). -C.47-52.
- 3. Трехмерная организация цитоплазматических нейроглобин-иммунопозитивных структур нейронов продолговатого мозга крысы / О.В. Кирик, И.П. Григорьев, О.С. Алексеева [и др.] // Биологические мембраны. -2016.-T.33, № 3.-C.207-212.
- 4. Ковальзон В.М. Нейрофизиология и нейрохимия сна. // Сомнология и медицина сна. Национальное руководство памяти А.М. Вейна и Я.И. Левина / под ред. М.Г.Полуэктова. М.: «Медфорум», 2016. С. 11—55.
- 5. Распределение нейроглобина в клетках Пуркинье мозжечка крысы / Д.Э. Коржевский, И.П. Григорьев, О.В. Кирик [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. -2015. № 6. C.459-461.

- 6. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях // Морфология. -2006. T. 129, № 1. C. 85-86.
- 7. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство / Д.Э. Коржевский, О.В. Кирик, М.Н. Карпенко [и др.] / под ред. Д.Э. Коржевского. 2-е изд., испр. и доп. СПб.: СпецЛит, 2014. 119 с.
- 8. Neuroglobin involvement in respiratory chain function and retinal ganglion cell integrity // C. Lechauve, S. Augustin, H. Cwerman-Thibault [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. -2012. – Vol. 1823, № 12. – P. 2261–2273.
- 9. Yang S., Xie L. Brain globins in physiology and pathology // Medical Gas Research. -2016. Vol. 6, No 3. P. 154-163.

УДК 577.156:616-092.18

Захаров А.С.¹, Матвеева И.В.², Короткова Н.В.³ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия AlexanderZakharov2019@yandex.ru1, i.matveeva@rzgmu.ru2, fnv8@yandex.ru3

Роль катепсинов в клеточной смерти и канцерогенезе

В статье рассмотрены вопросы строения и синтеза катепсинов, их локализации в нормальных и малигнизированных клетках, механизмы внутриклеточной регуляции активности катепсинов, механизмы индукции катепсинами клеточной смерти и роль катепсинов в развитии злокачественных опухолей.

Ключевые слова: катепсины, лизосомы, клеточная смерть, экзоцитоз, рак.

Zakharov A.S., Matveeva I.V., Korotkova N.V. RyazSMU, Ryazan, Russia

Role of cathepsins in cell death and cancerogenesis

This article is about the structure and synthesis of cathepsins, their localization in normal and malignated cells, mechanisms of regulation of cathepsin activity in cells, mechanisms of induction of cell death by cathepsins and the role of cathepsins in the development of malignant tumors.

Key words: cathepsins, lysosomes, cell death, exocytosis, cancer.

Введение. Способность клеток к программируемой клеточной гибели имеет большое значение для жизнедеятельности живого организма. Механизмы программируемой гибели клеток позволяют организму избавляться от повреждённых или старых и утративших свои функции клеток без развития воспаления, играют большую роль в эмбриогенезе различных органов, предотвращают развитие онкологических заболеваний.

На сегодняшний день науке известно более 10 механизмов осуществления программируемой клеточной гибели, которые так или иначе заканчиваются расщеплением жизненно важных компонентов клеток под воздействием гидролаз. Функционирование некоторых из этих ферментов, например каспаз, в настоящее время подробно изучено, в то время как об остальных до сих пор имеются неполные и зачастую отрывочные сведения.

К последней группе принадлежат и такие ферменты, как катепсины, которые в настоящее время активно исследуются сотрудниками кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО РязГМУ. В данной статье будет рассмотрено участие катепсинов в клеточной гибели и жизнедеятельности уже озлокачествлённых клеток.

Материалы и методы. Были отобраны англоязычные статьи из баз данных PubMed и Web of Science, найденные при помощи комбинаций ключевых слов «cathepsin», «cell death», «apoptosis», «autophagy», «cancer», «exocytosis» и опубликованные за последние 7 лет.

Поиск русскоязычных статей, включая работы кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО РязГМУ, проводился в базах данных Cyberleninka и E-library по комбинациям слов «катепсин», «клеточная гибель», «апоптоз», «аутофагия», «рак», «экзоцитоз». Учитывались статьи, опубликованные за последние 5 лет.

Результаты. *Что представляют собой катепсины?* Катепсинами называют довольно большую группу тканевых внутриклеточных протеаз, большинство из которых являются лизосомальными ферментами. В своей конформации они имеют два домена: R (right) с бета-складчатой вторичной структурой полипептидной цепи и L (left) из альфаспиралей, между которыми располагается активный центр, обусловливающий активность данных ферментов [1]. По аминокислотному составу активного центра катепсины разделяют на аспартатные (катепсины D, E), сериновые (катепсины A, G) и цистеиновые (катепсины B, C, H, F, L, K, S, X).

Большинство катепсинов (B, C, F, H и др.) обнаруживаются во всех тканях организма, однако некоторые являются специфичными для отдельных типов клеток: 1) катепсин K — для

остеокластов; 2) катепсин S — для различных видов антиген-презентирующих клеток (как «профессиональных» АПК — дендритных клеток и макрофагов, так и для «непрофессиональных» — B-лимфоцитов; 3) катепсин W — для NK-клеток и T-киллеров; 4) катепсин V(L2) — B многослойных эпителиях, ретикулоэпителиоцитах тимуса, кардиомиоцитах, клетках яичка и фолликулах яичника [2].

Полипептидная цепь катепсинов синтезируется на рибосомах гранулярной эндоплазматической сети в виде профермента, к которому присоединён сигнальный пептид. Сигнальный пептид обеспечивает доставку профермента с поверхности грЭПС в её просвет, после чего отщепляется. Внутри грЭПС с прокатепсинами происходят посттрансляционные модификации — образование дисульфидных связей и гликозилирование олигосахаридными остатками, содержащими концевую маннозу. В комплексе Гольджи маннозные остатки фосфорилируются с образованием маннозо-6-фосфата, после чего к ним присоединяются рецепторы маннозо-6-фосфата в мембранах цистерн комплекса Гольджи. Маннозо-6-фосфатные рецепторы, в свою очередь, связаны с белками адаптином-1 и клатрином, формирующими при активации рецепторов клатриновые везикулы, внутри которых и происходит доставка прокатепсинов в лизосомы. В кислой среде лизосом или под действием других лизосомальных гидролаз от прокатепсинов отщепляются маннозо-6-фосфатные рецепторы и N-концевой пропептид, в результате чего образуется зрелая форма катепсинов [1.3].

Лизосомальные катепсины выполняют множество функций внутри клеток: протеолиз фагоцитированного материала, расшепление дефектных собственных белков клеток, расшепление белков межклеточного матрикса (при экзоцитозе катепсинов) и др. В данной статье рассматривается участие катепсинов в осуществлении клеточной смерти и жизнедеятельности малигнизированных клеток.

Участие катепсинов в лизосомальной клеточной гибели. Катепсины играют важнейшую роль в осуществлении так называемой «лизосомальной клеточной гибели» [4]. Ключевым звеном, запускающим данный процесс, является повышение проницаемости лизосомальных мембран. Это может быть осуществлено под воздействием различных как внешних, так и внутренних стимулов: детергентов (сфингозина, ципрофлоксацина, метилового эфира лейциллейцина), активных форм кислорода и азота, токсинов, вирусных белков и даже собственных протеолитических ферментов или нарушения ионных градиентов между лизосомальным матриксом и цитоплазмой [5]. По-

вышение проницаемости лизосомальных мембран приводит к тому, что в цитоплазму выходит большое количество катепсинов, которые начинают расщеплять белки цитоскелета и белковые компоненты липопротеинов мембран клеточных органелл.

Однако в клетке имеется система, препятствующая активации катепсинов и осуществлению лизосомальной клеточной смерти:

- 1) от повреждений в результате действия катепсинов лизосомы защищены белками класса LAMP (lysosomal membrane proteins), которые на своём N-конце, направленном в просвет лизосомы, содержат остатки N-ацетилгалактозамина, составляющие защитное покрытие с внутренней стороны лизосомальных мембран против воздействия катепсинов [1,6];
- 2) активность катепсинов может угнетаться наличием внутриклеточных ингибиторов (например, цистатинов) или ингибирующим действием N-концевого пропептида, отделившегося при их попадании в лизосому [1,2];
- 3) наличием систем, утилизирующих повреждённые лизосомы: к N-ацетилгалактозамину LAMP-белков присоединяются белки галектины, с которыми образуют комплекс белки MAP (microtubule-associated proteins), что позволяет образовать двумембранные аутофагосомы вокруг повреждённых лизосом, ограничивая тем самым распространение повреждающего воздействия катепсинов, вышедших из лизосом в цитоплазму [6, 7];
- 4) рН цитоплазмы клетки составляет 7,3 и способен подавлять активность многих катепсинов, чей оптимум рН лежит в кислой среде (например, катепсинов B, C, D).

Таким образом, непосредственной причиной лизосомальной клеточной гибели редко является непосредственное расщепление катепсинами клеточных структур. Добиться такого эффекта можно лишь при одновременном повреждении большого количества лизосом. Однако, активность вышедших в цитоплазму катепсинов может быть достаточной для того, чтобы вызвать другой механизм клеточной гибели — внутренний путь апоптоза.

Как катепсины иниициируют апоптоза. Внутренний путь апоптоза в клетке контролируется рядом белков семейства Bcl-2 (B-cell lymphoma): проапоптотические Bak, Bax, Bid и антиапоптотические Bcl-xL, Bcl-2 и др. Белки Bak и Bax в активном состоянии способны олигомеризоваться и создавать каналы во внешней мембране мито-хондрий, через которые происходит выход цитохрома С в цитоплазму. Перечисленные антиапоптотические белки Bcl-xL и Bcl-2 связываются с активными центрами Bak и Bax, ингибируя их активность и

не давая формировать трансмембранные каналы. Белки Bcl-2 и Bcl-xL могут быть расщеплены активированным проапоптотическим белком t-Bid, что запустит внутренний путь апоптоза. Кроме семейства Bcl-2 белков, существуют и другие ингибиторы апоптоза, подавляющие активность инициаторных или исполнительных каспаз, например XIAP ингибирует каспазы-3,7,9 [8].

С точки зрения апоптогенности наибольшее значение для клеток имеют катепсины В, L и D. Их действие после выхода из лизосом в цитоплазму может быть обусловлено несколькими механизмами: 1) частичный протеолиз белка Віd, что приводит к его переходу в активную форму t-Віd, расщеплению антиапоптотических белков Всl-хL и Всl-2 и формированию трансмембранных каналов для цитохрома С из Вак и Вах; 2) катепсины могут напрямую расщеплять антиапоптотические белки Всl-2 и Всl-хL; 3) катепсины могут расщеплять ХІАР, препятствуя ингибированию инициаторных каспаз 3,7,9 [5].

После выхода цитохрома С в цитозоль он присоединяется к адаптерным белкам Apaf-1. Apaf-1 переводят связанный с ними ATФ или дATФ в AДФ или дAДФ, формируя гептамерный комплекс, называемый апоптосомой. Далее апоптосома за счёт CARD-доменов (caspase activating and recruiting domain) белков Apaf-1 присоединяет к себе прокаспазы-9 и активирует их, переводя их в инициаторные каспазы-9. Затем каспаза-9 частичным протеолизом активирует исполнительные каспазы-3,6,7, непосредственно расщепляющие жизненно важные оставляющие клетки [5,8].

Описанный механизм приводит к типичным для апоптоза изменениям: разрушению микротрубочек цитоскелета, конденсации и расщеплению хроматина и распада клетки на отдельные фрагменты, окружённые цитоплазматической мембраной — апоптотические тельпа.

Роль катепсинов в жизнедеятельности раковых клеток. В норме катепсинам присуща, в большей степени, лизосомальная локализация, обусловливающая их функцию по расщеплению фагоцитированного материала и протеолиза внутриклеточных белков. Однако, в патологически изменённых, например раковых, клетках значительно увеличивается доля экзоцитированного катепсина.

Обычно это происходит из-за гиперэкспрессии катепсинов вследствие активации рецепторов к интерлейкинам, фактору некроза опухоли или продуктам расщепления белков межклеточного матрикса. Данные рецепторы обладают тирозинкиназной активностью и фосфорилируют транскрипционные факторы STAT, которые в активном

состоянии объединяются в димеры и попадают в ядро, где усиливают транскрипцию генов катепсинов. Формирующиеся клатриновые везикулы и лизосомы с катепсинами по системе микротрубочек транспортируются на периферию клетки, к цитоплазматической мембране, где и накапливаются [2,9].

Экзоцитозу лизосом препятствует сеть подмембранных актиновых микрофиламентов, которая:

- 1) является механическим барьером для слияния лизосомальной и цитоплазматической мембран;
- 2) связывает активные центры белка синтаксина-4, члена семейства белков SNARE (SNAP receptor, SNAP soluble NSF attachment proteins, NSF N-ethylmaleimide-sensitive factor), необходимого для слияния лизосомальной и цитоплазматической мембран.

В случае, если под действием внешних или внутренних факторов активированы компоненты инозитолтрифосфатной сигнальной системы клетки или наблюдается нарушение нормальной функции кальциевых ионных каналов, внутри клетки повышается уровень Ca²⁺, вследствие чего активируются кальций-зависимые протеолитические ферменты, расщепляющие актиновые микрофиламенты (одним из таких белков может быть валлин). С разрушением актиновых микрофиламентов исчезает механический барьер между сливающимися мембранами, а белок синтаксин-4 цитоплазматической мембраны взаимодействует с другими белками семейства SNARE, находящимися в лизосомальной мембране, что приводит к сближению и слиянию мембран друг с другом и выходу катепсинов из клетки [9,10].

Выйдя из клетки, катепсины могут располагаться как непосредственно в межклеточном матриксе, так и быть прикреплены к наружной поверхности цитоплазматической мембраны за счёт различных белков (например, катепсин В может соединяться с белком аннексином) [1,2,11]. На тот факт, что за экзоцитоз катепсинов ответственны именно лизосомы, указывает нахождение мембраносвязанных катепсинов в участках циоплазматической мембраны, обогащённых белками LMP (вероятно, пришедшими в цитоплазматическую мембрану в результате её слияния с лизосомальной), клатрином и адаптином AP1 (обязательными компонентами клатриновых транспортных везикул) [2,9,12].

В межклеточном веществе катепсины могут расщеплять большое количество белков. Так, для катепсинов В, К, L, S, X показана протеолитическая активность в отношении тенасцина-С, фибронектина, остеонектина, ламинина, коллагена IV типа — основного компонента базальных мембран и др. [2]. Увеличение активности катепсинов вне

клетки ассоциируется с высокой инвазивностью опухолей и раннему развитию метастазов [13]. Описано повышение уровня катепсинов в таких опухолях, как карцинома молочной железы, карцинома яичника [14], рак поджелудочной железы [15], рак простаты [16], глиобластома [17] и проч.

Заключение. Таким образом, катепсины являются важной и многофункциональной группой протеолитических ферментов клеток.

Помимо основных своих задач, таких как расщепление фагоцитированных частиц или белковых компонентов собственных клеток, катепсины значимы для различных видов гибели клеток. Это делает их важным инструментом, при помощи которого происходит правильное эмбриональное развитие организма и уничтожение патологически изменённых клеток.

С другой стороны, секреция катепсинов злокачественно изменёнными клетками приводит к повышению инвазивности опухолей и раннему метастазированию, что является негативным прогностическим фактором для больного.

- 1. Ильичева А.С. Влияние гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей: Дис. ... канд. мед. наук: 03.01.04: утв. 29.05.2017. Рязань, 2017. 150 с.
- 2. Vidak E., Javoršek U., Vizovišek M., et al. Cysteine cathepsins and their extracellular roles: shaping the microenvironment // Cells. 2019. Vol. 8, No. 2. P. 264-288.
- 3. Pišlar A., Perišić Nanut M., Kos J. Lysosomal cysteine peptidases Molecules signaling tumor cell death and survival // Seminars in Cancer Biology. 2015. Vol 35. P. 168–179.
- 4. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death // Cell Death & Differentiation. 2018. Vol. 25, №3. P. 486–541.
- 5. Aits S., Jaattela M. Lysosomal cell death at a glance // Journal of Cell Science. 2013. Vol. 126, №9. P. 1905–1912.
- 6. Aits S., Kricker J., Liu B., Ellegaard A.-M., et al. Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay // Autophagy. 2015. Vol. 11, №8. P. 1408–1424.
- 7. Wang F., Gomez-Sintes R., Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death // Traffic. 2018. Vol. 19, Issue 12. P. 918-931.
- 8. Pistritto G., Trisciuoglio D., Ceci C., et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies // AGING. 2016. Vol. 8, №4. P. 603-619.

- 9. Xu J., A Toops K., Diaz F., et al. Mechanism of polarized lysosome exocytosis in epithelial cells // J Cell Sci. 2012. Vol. 125 (Pt 24). P. 5937-43.
- 10. Buratta S., Tancini B., Sagini K., et al. Lysosomal exocytosis, exosome release and secretory autophagy: the autophagic- and endo-lysosomal systems go extracellular // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, № 7. P. 2576-2596.
- 11. Aggarwal N., F Sloane B. Cathepsin B: multiple roles in cancer // Proteomics Clin Appl. 2014. Vol. 8, № 5-6. P. 427-437.
- 12. Anja P., Anahid J., Janko K. Cysteine cathepsins: Their biological and molecular significance in cancer stem cells // Seminars in Cancer Biology. 2018. Vol. 53. P. 168-177.
- 13. Tan J., Qian X., Song B., et al. Integrated bioinformatics analysis reveals that the expression of cathepsin S is associated with lymph node matastasis and poor prognosis in papillary thyroid cancer // Oncol Rep. 2018. Vol. 40, N1. P. 111-122.
- 14. Коваленко М.С., Кошулько П.А., Короткова Н.В. Катепсины как маркеры злокачественных новообразований молочных желёз // Наука молодых. 2019. Т.7, №2. С. 301-306.
- 15. Можейко Л.А. Механизмы воздействия панкреатит провоцирующих факторов на ацинарные и звездчатые клетки поджелудочной железы // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2019. Т.1, №2. С. 165-171.
- 16. Кугаевская Е.В., Тимошенко О.С., Гуреева Т.А. Роль протеолитических систем стромы в опухолевой прогрессии (обзор) // Общая реаниматология. 2019. № 15. С. 106-126.
- 17. Breznik B., Limback C., Porcnik A., et al. Localization patterns of cathepsins K and X and their predictive value in glioblastoma // Radiol Oncol. 2018. Vol. 52, №4. P. 433-442.

УДК 547.789.13: 547.834.22

Киндоп В.К.¹, Беспалов А.В.², Доценко В.В.³ Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия Slavakindop@mail.ru¹, bespalov-alex@mail.ru², victor_dotsenko_@mail.ru³

Синтез и свойства соединений на основе 2-хлор-N-(3,4-диарилтиазол-2(3H)-илиден) ацетамидов

Исследование реакционной способности α-роданокарбонильных соединений и соединений, полученных на их основе, установление структуры полученных соединений с помощью расчетных методов.

Ключевые слова: α -роданокарбонильные соединения, иминотиазолины, ацилирование, цианотиоацетамид, циклизация по Гуарески-Торпу.

Synthesis and properties of compounds based on 2-chloro-N - (3,4-diarylthiazole-2(3H) - ylidene) acetamide

Investigation of the reactivity of α -rhodanocarbonyl compounds and compounds derived from them, and determination of the structure of the resulting compounds using computational methods.

Key word: α -rodonachalnitsy compounds, aminothiazoline, the acylation, cyanothioacetamide, cyclization via the Guareschi-Thorpe.

Известно, что реакции α-роданокарбонильных соединений с аминами, и в частности, реакции фенацилроданида 1 с замещенными анилинами в присутствии кислотного катализатора — приводят к образованию замещенных производных тиазолин-2-имина 2 [1,2]. Органические соединения, которые содержат тиоцианогруппу, использовались в качестве прекурсоров для агрохимикатов, красителей и лекарств. Этот фрагмент является важной функциональной группой у нескольких противораковых агентов.

Нами установлено, что взаимодействие тиазолин-2-иминов 2 с хлорацетилхлоридом приводит к замещенным хлорацетамидам 3 с выходами 53-76 %. Данные соединения представляют интерес как реагенты для тонкого органического синтеза, а также как перспективные агрохимикаты или их предшественники. Нами расчетными методами был проведен предикторный анализ биологической активности синтезированных соединений с помощью ряда программных сервисов.

Первичный анализ структур проводили с помощью доступного сервиса OSIRIS Property Explorer. Согласно анализу, данные соединения удовлетворяют критериям Липински и являются биодоступными.

Строение полученных соединений подтверждено комплексом спектральных данных, а именно данными ЯМР-спектроскопии на ядрах 1 H и 13 C, и ИК-спектрофотометрии.

Хлорацетамиды **3** были введены в реакцию с различными 3-цианопиридин-2-(1H)-тионами **4** в присутствии оснований. В результате реакций были получены ранее не описанные продукты прямого S-алкилирования **5** с высокими выходами.

Добавление второго эквивалента основания и последующее нагревание реакционной смеси ведет к циклизации по Торпу-Циглеру и образованию ранее не описанных [3,4] производных тиено[2,3-b]пиридина $\mathbf{6}$, содержащих тиазолиновый фрагмент, которые потенциально могут обладать высоким фармакологическим потенциалом.

В то же время хлорацетамиды **3** были введены в реакцию с различными 3-цианохинолин-2-(1H)-тионами **7** в присутствии оснований. В результате реакций были получены ранее не описанные продукты прямого S-алкилирования **8** с высокими выходами.

Добавление второго эквивалента основания и последующее нагревание реакционной смеси аналогичным образом приводит к циклизации по Торпу-Циглеру и образованию ранее не описанных [3,4] производных тиено[2,3-b]хинолина 9, содержащих тиазолиновый

фрагмент, которые также потенциально могут обладать высоким фармакологическим потенциалом.

Решающую роль при этом играет возникновение качественно новых свойств аннелированной молекулы, увеличение возможности варьирования фармакофорных групп в различных ее положениях, а также способность взаимодействовать с более широким кругом рецепторов, находящихся в различных конформациях.

Строение полученных соединений **5** и **6** подтверждено данными ЯМР спектроскопии и ИК-спектрофотометрии.

В результате проведенных квантово-химических расчетов было установлено, что данные соединения могут существовать в форме двух основных конформаций, возникающих вследствие вращения вокруг связи C19—C20 (рис. 1). Конформация A (s-транс) закреплена водородной связью O21...H52 (длина 1,97 Å), в конформации В (s-цис) реализуется водородная связь N18...H52 (длина 2,01 Å).

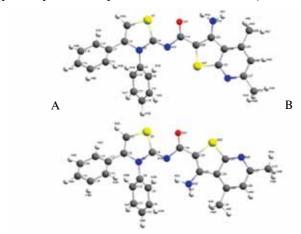


Рис. 1. Оптимизированные на уровне B3LYP-D3BJ/6-311G(2df,2pd) молекулярные структуры конформеров соединения **6**: $\mathbf{A} - (s\text{-mpahc})$, $\mathbf{B} - (s\text{-uuc})$

Конформация А является несколько более устойчивой, чем конформация В (разница в энергии составляет 3,8 кДж/моль).

Исследование структуры соединения **9** методом РСА показало, что в твердом состоянии (исследовался кристаллосольват с уксусной кислотой) молекула данного соединения находится в *s-цис* конфигруации (рис. 2).

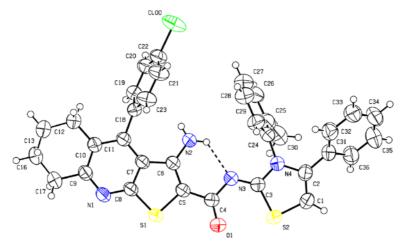


Рис. 2. Молекулярная структура соединения **9** по данным РСА (сольватная молекула уксусной кислоты не показана)

- 1. Sondhi, S.M., Johar, M., Singh, N. Synthesis of biscoupled heminthiazoline derivatives and their anticancer activity evaluation // Indian Journal of Chemistry. 2004. №43B. p. 175–260.
- 2. Beyer, H., Ruhlig, G. Über Thiazole, XXVI. Mitteil. Die Synthese von 3-substituierten Thiazolon-(2)-imiden aus α -Rhodanketonen // Chemische Berichte. 1956. Vol. 1. No.89. p. 107–114.
- 3. Litvinov, V.P., Dotsenko, V.V., Krivokolysko, S.G. Thienopyridines: synthesis, properties, and biological activity // Russian chemical bulletin. 2005. Vol. 54. N24. p. 864–904.
- 4. Litvinov, V.P., Dotsenko, V.V., Krivokolysko, S.G. The chemistry of thienopyridines // Advances in heterocyclic chemistry. 2007. №93. p. 117–178.

УДК 577.15: 577.123

Кириллова Н.В., Спасенкова О.М., Ли А.О.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург nadezhda.kirillova@pharminnotech.com

Влияние малобена на содержание общих липидов и гликогена в печени и мышцах при экспериментальном стеатозе печени

Исследован уровень общих липидов печени, а также содержание гликогена в печени и мышцах в норме и при экспериментальном стеатозе печени у мышей. Изучено влияние экспериментального вещества малобена на эти показатели в группе животных с экспериментальной патологией.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, малобен, общие липиды, гликоген.

Kirillova N.V., Spasenkova O.M., Li A.O.

FSBTI "St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University"

Ministry of Health of the Russian Federation

St. Petersburg

The effect of maloben on the content of total lipids and glycogen in the liver and muscles during experimental liver steatosis

We studied the level of total liver lipids, as well as the glycogen content in the liver and muscles, normal and in experimental liver steatosis in mice. The effect of experimental malobena on these parameters in the group of animals with experimental pathology was studied.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease, maloben, general lipids, glycogen

В основе неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) лежат нарушения углеводного и жирового обменов. Для лечения НАЖБП используют как медикаментозные, так и не медикаментозные средства. На этапе моделирования патологий в лабораторных условиях эффективность такого лечения можно оценить по изменениям биохимических показателей в органах-мишенях, таких как печень и мышцы.

Целью исследования было изучение влияния нового экспериментального соединения — производного малоновой кислоты (4,4'-(пропандиамидо)дибензоат натрия, малобен) на содержание общих липидов печени, а также уровень гликогена в печени и мышцах при экспериментальном стеатозе печени [2].

Исследования выполнены на мышах-самцах линии C57bl/6 массой 18-22 г. Животные были разделены на 3 группы, в каждой из которых находилось от 7 до 12 животных. Модель НАЖБП у экспериментальных животных создавалась путем введения в рацион питания больших количеств легко усваиваемых углеводов, а также добавления к стандартному корму (63%) топленого свиного жира (19%), сахарозы (10%) и изолированного соевого белка (8%) [4]. Интактные животные получали стандартный корм. Третья группа животных на фоне высокожировой диеты получала ежедневно внутрижелудочно растворенную в воде очищенной субстанцию малобена (10 мг/кг). Длительность эксперимента составляла 24 недели. Интактные и контрольные животные ежедневно получали воду очищенную в том же количестве, что и экспериментальные.

Определение общих липидов из ткани печени проводили методом Фолча. Содержание общих липидов вычисляли по соотношению массы сухого экстракта к массе образца ткани [3].

Методика количественного определения гликогена основана на способности выделенного из тканей полисахарида образовывать окрашенные комплексы с йодом в присутствие насыщенного раствора кальция хлорида [1].

Полученные в данном исследовании результаты представлены в табл. 1.

Как видно из полученных результатов, при жировой болезни печени достоверно снижается содержание гликогена в гепатоцитах печени в 1,4 раза и в 1,5 раз в скелетных мышцах на фоне незначительного увеличения содержания общих липидов в печени лабораторных мышей по сравнению с группой интактных животных. В группе животных, получающих экспериментальное вещество малобен на фоне высококалорийной диеты, наблюдалось достоверное падение гликогена в печени и в скелетных мышцах соответственно в 1,7 и в 1,9 раза. Содержание общих липидов в печени этой группы животных также было снижено на 8% по сравнению с контрольной группой мышей.

Таблица 1. Содержание общих липидов в печени и гликогена в тканях печени и скелетных мышц мышей при экспериментальном стеатозе

Группа мышей	Общие липиды печени, %	Гликоген печени, мг/г ткани,	Гликоген скелет- ныхмышц, мг/г ткани,
Интактные мыши (стан- дартный корм), n=	6,36+0,23	0,95±0,08	0.40+0,03
Контроль, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), n=	6,70+0,21	0,66±0,06*	0,27+0,02*
Высококалорийная диета+экспериментальное вещество, производное малоновой кислоты, n=	5,83+0,49	0,40±0,02*#	0,0145+0,001*#

Примечание: * p<0,05 по отношению к интактным животным, # p<0,05 по отношению к контрольным животным.

Таким образом, изучаемое экспериментальное соединение малобен (производное малоновой кислоты (4,4'-(пропандиамидо)дибензоат натрия) вызывал подавление синтеза общих липидов в печени, что указывает на перспективность применения данного соединения при ожирении и заболеваниях, являющихся его осложнением.

Полученные в нашей работе метаболические эффекты малобена, безусловно, требуют дальнейшего углублённого изучения антистеатозного лействия ланного вещества.

- 1. Давченко Е.О., Чиркин А.А. Новый методический подход к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов // Судебно-медицинская экспертиза. -2010. №3. -C. 25-28.
 - 2. Патент РФ № 2702003/03.10.2019.
- 3. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учебное пособие / под ред. М. Прохоровой. -Л.: изд-во ЛГУ, 1982-272 с.
- 4. Xu, B. L. et al. Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile c57bl/6j mice // BioMed Research International. 2015. Vol 2. P.1-7.

УДК 577.121.7

Кличханов Н.К.¹, Джафарова А.М.¹, Аль-Рабии М.А.М.¹, Газимагомедова М.М.²

ФБГОУ ВО «Дагестанский государственный университет» ¹, Махачкала, Россия ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» ², Махачкала, Россия klich-khan@mail ru¹

Липидный состав плазмы крови крыс при умеренной гипотермии

Гипотермия сопровождается стрессорной реакцией, при которой происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. В результате этого увеличивается распад гликогена и липидов, что может привести к изменению липидного состава различных тканей. Исследование липидного спектра плазмы крови при кратковременной умеренной гипотермии показало, что на начальных этапах снижения температуры тела крыс повышается содержание триацилглицеролов и общего холестерина. Изменения концентрации общего холестерина происходят за счет холестерина ЛПВП. В динамике пролонгирования гипотермического состояния уровни данных маркеров липидного обмена нормализуются.

Ключевые слова: гипотермия, крысы, кровь, липиды.

Klichkhanov N.K., Jafarova A.M., Al-Rabii M.A.M., Gazimagomedova M.M. Dagestan State University, Makhachkala Dagestan State Medical University, Makhachkala

Lipid composition of rat blood plasma at moderate hypothermia

Hypothermia is accompanied by a stress reaction, in which the hypothalamic-pituitary-adrenal system is activated. As a result, the breakdown of glycogen and lipids increases, which can lead to a change in the lipid composition of various tissues. The study of the lipid spectrum of blood plasma during short-term moderate hypothermia showed that at the initial stages of a decrease in body temperature in rats, the content of triacylglycerols and total cholesterol increases. Changes in total cholesterol concentration are due to HDL cholesterol. In the dynamics of prolongation of the hypothermic state, the levels of these markers of lipid metabolism are normalized.

Key words: hypothermia, rats, blood, lipids.

В последние годы гипотермические состояния все чаще находят применение в медицинской практике. Клинически доказана эффек-

тивность её использования при операциях на сердце и мозге [13], инсульте, инфаркте, неонатальной гипоксии [3], травмах [9]. Оказалось, что гипотермия способствует защите различных органов и тканей от последствий их гипоксических, ишемических и реперфузионных повреждений. В терапевтических целях чаще всего используют умеренную гипотермию [11]. Однако, на начальных этапах развития, гипотермия сопровождается стрессорной реакцией, при которой происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [7]. В результате включаются механизмы химической терморегуляции, направленные на увеличение теплопродукции: усиливается обмен веществ, увеличивается распад гликогена и липидов, повышается содержание глюкозы и жирных кислот в крови [1]. Все это может привести к развитию ряда патологических процессов, выраженность которых может зависеть от длительности воздействия низкотемпературного фактора. В связи с этим, для разработки надлежащего эффективного лечения возникает необходимость тщательного и всестороннего изучения всех изменений, которые происходят в организме на различных временных отрезках его охлаждения. Целью данной работы явилось исследование липидного состава плазмы крови крыс при гипотермии различной длительности.

Материалы и методы исследования. Опыты выполнены на беспородных белых крысах-самцах, массой 200-220 г. Содержание животных осуществлялось в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)».

Общую гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в камере, в рубашке которой циркулировала холодная вода. Температуру тела крыс равномерно снижали до 30°C в течение 30 мин (кратковременная умеренная гипотермия) и поддерживали в течение 1,5 и 3 ч (пролонгированная гипотермия).

После декапитации крыс собирали кровь в пробирки с гепарином. Кровь центрифугировали 5 мин при 1500g. Полученную плазму повторно центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин для осаждения лейкоцитов. Содержание триацилглицеролов, общего холестерина, холестерина ЛПНП и ЛПВП, в плазме крови крыс определяли на биохимическом анализаторе UniCel DxC 800 PRO автомат (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием пакетов прикладных программ Statistica-6.0. Достоверность различий средних величин оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при значениях p < 0.05.

Результаты и их обсуждение. Анализ изменений липидного состава плазмы крови при гипотермии показал, что сразу после снижения температуры тела до 30°C содержание триацилглицеролов в плазме возрастает на 28% (рис. 1). По мере пролонгирования гипотермии содержание триацилглицеролов в крови снижается до контрольного уровня.

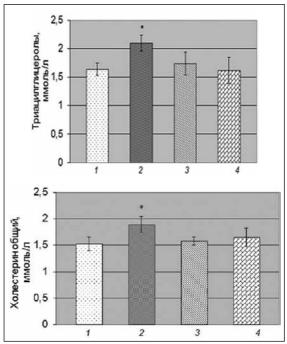


Рис. 1. Содержание триацилглицеролов и холестерина в плазме крови крыс при гипотермии

В плазме крови триацилглицеролы находятся в основном в составе хиломикронов и ЛПОНП [4]. Поскольку кровь для анализа брали утром до приема пищи, то уровень триацилглицеролов определяется в основном содержанием в плазме ЛПОНП. При кратковременной умеренной гипотермии содержание ЛПОНП в плазме крови крыс возрастает на 36% [7]. Повышение содержания триацилглицеролов при гипотермии, видимо, связано с торможеним рецептор-зависимого эндоцитоза клетками тканей ЛПОНП [8]. В плазме крови крыс при гипотермии существенно увеличивается свободные жирные кислоты [5]. Показано, что

свободные жирные кислоты ингибируют липопротеинлипазу эндотелия капилляров [15]. Это, в свою очередь, может быть причиной снижения гидролиза триацилглицеролов в составе ЛПОНП.

При кратковременной гипотермии 30°C на 23,5% повышается содержание холестерина в плазме крови (рис. 1), но после пролонгирования гипотермии его уровень нормализуется. Эти результаты согласуются с данными литературы [6, 7]. Повышение в той или иной мере уровня общего холестерина крови при гипотермии и увеличение доли его свободной формы было обнаружено и другими исследователями [10, 7].

Повышение уровня холестерина при кратковременной гипотермии 30° С у крыс происходит в основном за счет холестерина ЛПВП (r=0.86) (рис. 2). Нарастание содержания в плазме крови суммарного холестерина ЛПВП связывают с повышением активности лецитин-холестеринацилтрансферазы при умеренной (28° С) гипотермии [2]. При этом гипотермия не влияет на уровень холестерина в составе ЛПНП (рис. 2).

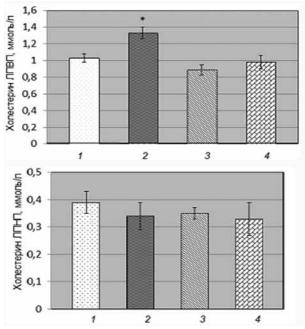


Рис. 2. Содержание холестерина ЛПВП и ЛПНП в плазме крови крыс при гипотермии

Таким образом, при кратковременной гипотермии содержание холестерина увеличивается в составе ЛПВП. Эти липопротеины забирают избыток холестерин с плазматических мембран клеток крови и периферических тканей и доставляют в печень и другие ткани [4].

Пролонгирование гипотермии до 3 часов способствует нормализации исследованных показателей липидного обмена, что свидетельствует об активации на определенных этапах гипотермии компенсаторно-приспособительных реакций. При пролонгированной 3 ч гипотермии 23°С методами флуоресцентного двумерного гельэлектрофореза и масс-спектрометрии в печени крыс была обнаружена повышенная экспрессия белка аполипопротеина А-1 [12], который участвует преимущественно в транспортировке холестерина из тканей в печень. Нормализация уровня холестерина в крови при пролонгированной умеренной гипотермии, обнаруженная нами, возможно, также связана с увеличением его транспорта в печень при участии аполипопротеина А-1. Было показано, что аполипопротеин А-1 уменьщает повреждение ткани почек и миокарда при ишемии/реперфузии, а также подавляет образование воспалительных цитокинов и предотвращает активацию нейтрофилов у крыс [14].

- 1. Волжина Н. Г. Углеводный и энергетический обмен головного мозга при адаптации к переохлаждениям: автореф. дис. ... доктора биол. наук: 03.00.04 / Ростов-на-Дону, 1992; с.36.
- 2. Гурин, В. Н. Обмен липидов при гипотермии, гипертермии и лихорадке / В. Н. Гурин. Мн.: Беларусь, 1986. 190 с.
- 3. Каленова И.Е., И.А. Шаринова, О.А. Шевелев, А.В. Бутров. Опыт применения терапевтической гипотермии в лечении ишемического инсульта // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2012, №2. -С. 41-44.
- 4. Климов, А. Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения / А. Н. Климов, Н. Г. Никульчева. СПб.: ПитерКом, 1999. 512 с.
- 5. Кличханов Н. К., Эмирбеков Э. 3. Влияние даларгина на содержание белковых и липидных компонентов в сыворотке крови при гипотермии // Известия высш. учебн. завед. Сев.-Кавказ рег. Естеств. науки. 2001. № 3. С. 55-57.
- 6. Маяхи М. Т. Д., Таджибова Л. Т., Даудова Т. Н., Кличханов Н. К. Влияние гипотермии на содержание гормонов и липопротеинов в плазме крови крыс // Вестник Дагестанского гос. университета. Естеств. Науки. -2012.- вып. 1.- С. 140-143.

- 7. Маяхи М.Т. Д., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на содержание гормонов гипофизарно-надпочечникового и гипофизарно-тиреоидного эндокринного комплексов в крови крыс при гипотермии // Известия Самарского научного центра РАН. 2012, №14. С. 273-77.
- 8. Титов В. Н., Нарушение транспорта в клетки насыщенных жирных кислот в патогенезе эссенциальной гипертонии // Клинич. лаб. диагностика. 1999. №. 2. С. 3-9.
- 9. Усенко Л.В., Царев А.В. Искусственная гипотермия в современной реаниматологии // Общая реаниматология. 2009. Т.5, №1. С.21-23.
- 10. Эмирбеков Э.З., Львова С. П., Кличханов Н. К. Биохимические изменения в крови при искусственной и естественной гипотермии // Пробл. криобиол. -1995. -№ 1. С. 14-21.
- 11. Liu L., Yenari M. A. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms // Frontiers in Bioscience. 2007. Vol. 12. P. 816-825.
- 12. Oda T., Shimizu K., Yamaguchi A., Satoh K., Matsumoto K. Hypothermia produces rat liver proteomic changes as in hibernating mammals but decreases endoplasmic reticulum chaperones // Cryobiology. 2012. Vol. 65. P. 104-112.
- 13. Schaller B, Graf R. Hypothermia and stroke: the pathophysiological background. Review // Pathophysiology. 2003. Vol. 10. P. 7–35.
- 14. Shi N., Wu M.P. Apolipoprotein A-1 attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats // J. Biomed. Sci. 2008. Vol. 15. P. 577-583.
- 15. Van Amersfoort E. S., Van Berkel T. J. C., Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock // Clin. Microbiol. Rev. -2003. Vol. 16, No. 3. P. 379-414.

УДК 615.099.07

Крысько М.В., Стрелова О.Ю., Головина А.Е., Шаландаева М.С. ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, Санкт-Петербург krysko.marina@pharminnotech.com

Трудности интерпретации результатов химико-токсикологического анализа при обнаружении лекарственных веществ с особенностями метаболизма (фенибут, селегилин, мебеверин)

Требуют серьезного изучения особенности метаболизма ряда лекарственных средств, медикаментозное применение которых может вызвать положительные результаты при проведении освидетельствования на факт употребления психоактивных веществ. Одной из причин могут быть кросс — реакции между аналитами. Они возникают вследствие приема лекарственных препаратов, не относящихся к наркотическим и психотропным.

Ключевые слова: метаболизм, кросс-реакции, фенибут, селегилин, мебеверин, дюспаталин.

Krysko M.V., Strelova O.Yu., Golovina A.E., Shalandaeva M.S. St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg

Difficulties in interpreting the results of chemical-toxicological analysis in the detection of drugs with metabolic features (phenibut, selegiline, mebeverine)

The metabolic features of a number of drugs require a serious study, the drug use of which can cause positive results during the examination for the fact of the use of psychoactive substances. Cross-reactions between analytes can be one of the reasons. They arise as a result of taking medications that are not narcotic and psychotropic.

Key words: immunochromatographic analysis, cross-reactions, phenibut, selegiline, mebverine, duspataline.

В современной медицинской практике лабораторные исследования на наркотические средства, психотропные и токсические вещества являются необходимой составляющей обследований для установления факта употребления, срока давности и продолжительности приема токсических веществ. Согласно Приказу МЗ РФ № 933н от 18 декабря 2015 г. и Приказу МЗ и СР РФ № 40 от 27 января 2006 г. проведение химико-токсикологического исследования биологического объекта должно осуществляться предварительными иммунохимическими методами и подтверждающими методами газовой и (или) жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с помощью технических средств, обеспечивающих регистрацию и обработку результатов исследования путем сравнения полученного результата с данными электронных библиотек масс-спектров [1, 2].

При использовании в качестве предварительных испытаний иммено-хроматографических тест-полосок возможны кросс-реакции (перекрёстные реакции) между аналитами, приводящие к неверному результату. Они возникают вследствие наличия присутствия в моче освидетельствуемого лекарственных препаратов или их метаболитов, не относящихся к наркотическим и психотропным, но имеющим в своей структуре характерный фрагмент, которые и вступают во взаимодействие с антителом тест-полоски. По данным литературы наличие перекрестных реакций с другими соединениями и, как следствие, ложноположительных результатов может быть до 10-15% [2,3]. Ложноположительный результаты на присутствие психоактивных вещества отрицательно сказываются на репутации человека, а в некоторых случаях дискредитируют его и незаслуженно ограничивают в правах.

В настоящее время представляют интерес такие препараты, как мебеверин, селегелин и фенибут. При медикаментозном употреблении данных веществ возможно получение ложноположительного теста на психоактивные вещество из группы фенилалкиламина в силу особенностей их метаболизма. Фенилалкиламины — это обширная группа психоактивных веществ растительного и синтетического происхождения. Фенилалкиламины оказывают стимулирующее действие на нервную систему, и в данные момент их применение в Российской Федерации запрещено [3, 4].

Фенибут (аминофенилмасляная кислота) — производное фенилэтиламина (рис. 1).

Рис. 1. Химическое строение фенибута

В метаболизме фенилалкиламинов можно выделить следующие основные процессы: в I фазе метаболизма происходит окислительное дезаминирование, N — деметилирование, гидроксилирование ароматического кольца, деалкилирование у азота боковой цепи; во II фазе гидроксилированные метаболиты образуют конъюгаты с аминокислотой глицином, серной и глюкуроновой кислотами. Одним из метаболитов аминофенилмасляной кислоты как производного фенилэтиламина является метамфетамин [5, 6, 7].

Селегелин (Юмекс — селегелина гидрохлорид) — противопаркинсоническое средство, по химической структуре является производным фенилэтиламина. Селегелин проходит сложный метаболический путь. С помощью цитохрома P450 образует L-десметилселегелин (норселегелин), L-амфетамин и L-метиламфетамин [8,9]. Было обнаружено, что иммуноанализ с флуоресцентной поляризацией на амфетамин и метамфетамин приводит к положительным результатам, подтверждённым с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии, в течение 2 дней после однократного приема внутрь селегилина (рис. 2).

Рис. 2. Схема метаболизма мебеверина

Норселегелин, единственный специфический метаболит селегилина, был обнаружен только в течение 12 часов. Кроме того, норселегилин не был обнаружен во всех образцах мочи от пациентов с длительным приемом селегилина. Поскольку дифференциация потребления селегилина от злоупотребления амфетаминами путем выявления норселегилина в большинстве случаев затруднена, была разработана процедура энантиоселективной газовой хромато-массспектрометрии. Это позволило дифференцировать энантиомеры метаболитов селегилина и тем самым отделить потребление селегилина от злоупотребления метамфетамином и / или амфетамином [10-13].

Мебеверин (дюспаталин) — спазмолитическое средство, применяемое при лечении синдрома раздраженного кишечника. Он является сложным эфиром вератриновой (3,4-диметоксибензойной) кислоты и мебеверинового спирта. Мебеверин метаболизирует путем гидролиза сложного эфира до мебеверинового спирта и вератриновой кислоты (рис. 3). Выводится преимущественно с мочой только в виде мета-

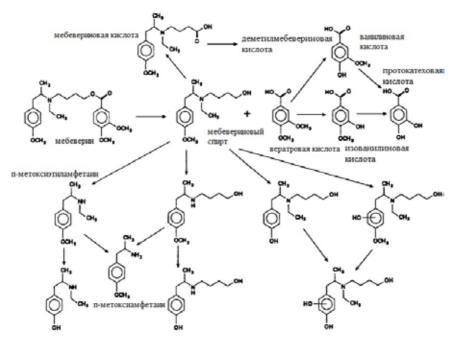


Рис. 3. Схема метаболизма мебеверина [17]

болитов — вератровой кислоты и мебеверинового спирта, частично в виде мебевериновой кислоты, частично — в виде деметилмебевериновой кислоты [14, 15, 16].

Однако по данным ряда авторов некоторые пробы мочи давали положительный результат на амфетамины с флуоресцентным поляризационным иммуноферментным анализом, кроме того, были найдены пара-метоксиамфетамин, метоксиэтиламфетамин и гидроксиэтиламфетамин в этих образцах [17]. Неверной интерпретации подобных результатов происхождения метамфетамина можно избежать путем обнаружения специфических метаболитов мебеверина, которые выделяются при длительном применении [17].

Неожиданные и спорные результаты обязательно должны быть обсуждены с пациентом, особенно, если субъект никогда не наблюдался у наркологов и не состоял на наркологическом учете. Поэтому необходимо подтверждение наличие токсических веществ более специфическими методами, такими как хромато-масс-спектрометрия.

Таким образом, требуют серьезного изучения особенности метаболизма ряда лекарственных средств, медикаментозное применение которых может вызвать положительные результаты при проведении освидетельствования на факт употребления психоактивных веществ.

- 1. Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ [Электронный ресурс] : приказ Мин-ва ЗО РФ от 27.01.2006 г. № 40. Доступ из справ. правовой системы «КонсультантПлюс».
- 2. Назаренко, Г.Г. Иммунная хроматография как предварительный метод химико-токсикологического анализа. Анализ ложноположительных результатов / Г.Г. Назаренко // Избранные вопросы судебно-медицинской экспертизы. Хабаровск, 2017 N 16. С. 56-60.
- 3. Сорокина, Ю. А. Влияние лекарственных средств на результаты лабораторных исследований на наркотические и психотропные вещества / Ю. А. Сорокина, А. Н. Солдатова, А. В. Занозин и др. // Международный научно-исследовательский журнал. 2019. № 12 (90) Часть 2. С. 210—214.
- 4. Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Фе-

- дерации [Электронный ресурс] : Постановление Правительства РФ от 30.06.1998 г. No 681. Доступ из справ. правовой системы «КонсультантПлюс».
- 5. Ahuja T, Mgbako O, Katzman C, Grossman A. Phenibut (β -Phenyl- γ -aminobutyric Acid) Dependence and Management of Withdrawal: Emerging Nootropics of Abuse. Case Rep Psychiatry. 2018. 3 pages.
- 6. Смирнова, Л.А. Фармакокинетические особенности лекарственных средств, производных гамма-аминомасляной кислоты, фенибута и цитрокарда / Л.А. Смирнова, В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков, А.Ф. Рябухова, Е.А. Сучков //Волгоградский научно-медицинский журнал. 2013. С. 23-25.
- 7. Регистр лекарственных средств: энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента [Электронный ресурс] / Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_5320.htm
- 8. Kalász H, Magyar K, Szőke É, et al. Metabolism of selegiline [(-)-deprenyl)]. Curr Med Chem. 2014;21(13):1522-1530.
- 9. Magyar K. The pharmacology of selegiline. Int Rev Neurobiol. 2011;100:65-84.
- 10. Chen L, Shen B, Wang S, et al. Pharmacokinetics of selegiline, R-methamphetamine, R-amphetamine, and desmethylselegiline in oral fluid after a single oral administration of selegiline. Drug Test Anal. 2019;11(6):898-905.
- 11. Mascher HJ, Kikuta C, Millendorfer A, Schiel H, Ludwig G. Pharmacokinetics and bioequivalence of the main metabolites of selegiline: desmethylselegiline, methamphetamine and amphetamine after oral administration of selegiline. Int J Clin Pharmacol Ther. 1997;35(1):9-13.
- 12. Roselaar, S. E., Langdon N., Lock C. B., Jenner P., Parkes J. D. Selegiline in Narcolepsy, *Sleep*, Volume 10, Issue 5, September 1987, P. 491–495.
- 13. Yasar S, Bergman J. Amphetamine-like effect of 1-deprenyl (selegiline) in drug discrimination studies. Clin Pharmacol Ther. 1994.—56.—6 Pt 2.—P. 768-77.
- 14. Kristinsson J, Snorradóttir I, Jóhannsson M. The metabolism of mebeverine in man: identification of urinary metabolites by gas chromatography/mass spectrometry. Pharmacol Toxicol. 1994.— 74.— 3.— P. 174-180.
- 15. Moskaleva N.E., Baranov P.A., Mesonzhnik N.V., Appolonova S.A. HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of desmethylmebeverine acid, mebeverine acid and mebeverine alcohol in human plasma along with its application to a pharmacokinetics study. J Pharm Biomed Anal. 2017.—138.—P.118-125.

- 16. Хохлов, А.Л. Исследование фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением / А.Л. Хохлов, Ю.А. Джурко, Л.Н. Шитов, И.И. Яичков, А.М. Шитова, Л.А. Хозова, А.Е. Мирошников // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2017. № 1.
- 17. Kraemer T, Wennig R, Maurer HH. The antispasmodic drug mebeverine leads to positive amphetamine results by fluorescence polarization immunoassay (FPIA)--studies on the toxicological analysis of urine by FPIA and GC-MS. J Anal Toxicol. 2001.—25.—5.—P. 333-338.

УДК 612.616:616-003.725

Лукашевич В.С., Новаковская С.А., Пыж А.Э., Рудниченко Ю.А., Хрусталёва Т.А.¹ ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск tanissia.lir@gmail.com¹

Структурно-функциональный анализ состояния организма экспериментальных животных под влиянием длительного приёма алкоголя

При длительной алкогольной интоксикации у экспериментальных животных происходят изменения липидного, углеводного и белкового обмена; угнетение сахаролитической микрофлоры, смещение количественного соотношения в сторону патогенной флоры Proteus mirabilis, Klebsiella spp.; поражение печени, сопровождающееся диффузной жировой дистрофией органа, некрозом печеночных клеток и циррозом.

Ключевые слова: хроническая алкогольная интоксикация, микрофлора, метаболизм, структурная организация печени.

Lukashevich U.S., Novakovskaya S.A., Pyzh H.E., Rudnichenko Y.A., Khrustaleva T.A.

SSI «Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk

Structural and functional analysis of the state of the organism of experimental animals under the influence of long-term alcohol intake

Changes in lipid, carbohydrate and protein metabolism occur in experimental animals with prolonged alcohol intoxication; as well as suppression of saccharolytic microflora, a shift in the quantitative ratio towards the pathogenic flora: Proteus

mirabilis, Klebsiella spp.; liver damage accompanied by diffuse fatty degeneration of the organ, liver cell necrosis and cirrhosis.

Key words: chronic alcohol intoxication, microflora, metabolism, structural organization of the liver.

Несмотря на прилагаемые разнонаправленные усилия в борьбе с алкоголизмом в большинстве экономически развитых стран наблюдается постоянное увеличение потребления спиртных напитков. Известно, что алкоголь увеличивает риск возникновения большого числа заболеваний, не связанных с ним напрямую и затрагивающих практически все жизненно важные системы и органы человека. Вместе с тем, первичными мишенями токсического поражения алкоголем являются ЖКТ и печень, в которой происходит основной метаболический распад (более 90%) спирта сначала до ацетальдегида и далее до уксусной кислоты [1].

При хроническом алкогольном поражении печени возникают в той или иной степени нарушения метаболических процессов. Нарушение синтеза белка приводит к изменению аминокислотного состава крови, разладу процессов обезвреживания аммиака (мочевинообразования). Воспалительно-некротические процессы в печени сопровождаются нарушением иммунного статуса и активацией провоспалительных цитокинов [2].

Алкоголь нарушает процессы пристеночного пищеварения, изменяет строение плазматических мембран клеток кишечной стенки. Даже однократное употребление чрезмерной дозы алкоголя оказывает отрицательное влияние на микрофлору кишечника и приводит к развитию дисбактериоза, тогда как регулярное — приводит к стойкому нарушению микробиоценоза кишечника [1].

Характерным признаком алкогольного поражения печени является выявление стеатоза перипортальных гепатоцитов в сочетании с перигепатоцеллюлярным фиброзом, а также лобулярная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами с участками фокального некроза. В различной степени в паренхиме выражен внутрипеченочный холестаз, микронодулярный цирроз. На поздних стадиях цирроз нередко приобретает черты макронодулярного, что ассоциировано с повышением риска развития гепатоцеллюлярной карциномы [3].

Материалы и методы.

Эксперименты выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 130 ± 20 г, в строгом соответствии с правилами гуманного отношения к лабораторным животным, соблюдением биоэтических норм и требований Международного комитета по науке.

Животные были разделены на 2 группы: 1-я группа — половозрелые крысы, содержавшиеся в стандартных условиях с постоянным доступом к чистой воде и корму (контроль); 2-я группа — экспериментальные животные, которые были вынуждены употреблять 15% раствор этанола в качестве единственного источника жидкости на протяжении 40 суток.

Содержание триглицеридов, общего холестерина, холестерина в липопротеинах высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерина в липопротеинах низкой плотности (ХС ЛПНП) определяли с помощью наборов фирмы НТПК «Анализ Х» (РБ), а уровни общего белка, глюкозы и мочевины, активность АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛДГ и щелочной фосфатазы в сыворотке крови — с помощью наборов фирмы «Диасенс» (РБ).

Посев содержимого кишечника осуществляли на дифференциально-диагностические среды для обнаружения бифидо- и лактобактерий, энтеробактерий, энтерококков, стафилококков, дрожжей и плесневых грибов. Проводили видовую идентификацию культур и их количественную оценку. Концентрация микроорганизмов представлена в log KOE/г.

Морфологическое исследование выполнено на биоптатах печени. Использовали гистологический и электронно-микроскопический методы исследования. Биопсийный материал извлекался из области ворот печени. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (толщина среза $-8\,$ мкм) и суданом III (толщина среза $-12\,$ мкм). Для проведения электронно-микроскопических исследований экспериментальный материал обрабатывался по общепринятой методике [4].

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0. Нормальность распределения показателей проверяли тестом Шапиро—Уилка. Данные по концентрации микроорганизмов представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней ($M\pm m$). Статистическую значимость различий между группами оценивали по U-критерию Манна—Уитни. Достоверным считали уровень значимости $p\leqslant 0.05$.

Результаты и их обсуждение.

Метаболические показатели сыворотки крови при моделировании хронической алкогольной интоксикации. Анализ липидного профиля в сыворотке крови экспериментальных животных показал, что уровень триглицеридов достоверно повышался на 14,1% по сравнению с контролем, на фоне отсутствия изменений в содержании общего холестерина, что может быть связано с подавлением липогенеза и окисления глюкозы в жировой ткани [5]. Концентрация ХС ЛПВП в сыворотке крови крыс, получавших этанол, значительно снижалась (на 19%), что согласуется с данными литературы [6].

Содержание глюкозы в сыворотке крови животных с алкогольной интоксикацией, значимо увеличилось на 20,7% по отношению к контролю. Развитие гипергликемии при длительной алкогольной интоксикации является следствием интоксикационного стресса [7]. При длительном потреблении алкоголя может происходить формирование гипогликемии вследствие истощения запасов гликогена печени и торможения глюконеогенеза [8].

При длительном введении 15% раствора этанола крысам также наблюдалось достоверное повышение уровня общего белка (на 7%).

Если ещё несколько лет назад в соответствии с рекомендациями ВОЗ при хронической алкогольной интоксикации определяли трансаминазы АЛТ и АСТ, то в настоящее время из-за выявившейся чувствительности к алкогольным нарушениям печени, все более информативным показателем становится активность ГГТ (КФ 2.3.2.1). В наших экспериментах при моделировании алкогольной интоксикации зафиксировано увеличение активности ГГТ более чем в 2 раза (на 203%), тогда как активности других НАДН-зависимых ферментов, а также содержание мочевины увеличивались незначительно, что соответствует данным других исследователей [9] и может быть свидетельством относительной устойчивости гепатоцитов крысы в условиях данного эксперимента.

Сравнительный анализ микрофлоры кишечника крыс в норме и при моделировании хронической алкогольной интоксикации. Показано, что хроническое поступление этанола в пищеварительный тракт крыс неблагоприятно воздействует на кишечные микроорганизмы. Выявлены значительные колебания показателей по молочнокислым бактериям: бифидобактерии не превышали $6,13\pm0,21$ Log KOE/г, что уступает контролю на 35%. Менее выраженное токсическое действие этанол оказал на лактобациллы, содержание которых уступает контролю на 19,1% с $8,81\pm0,08$ до $7,13\pm0,21$ Log KOE/г (p<0,05). Подавление роста анаэробов ранее наблюдали в аналогичных исследованиях, так, содержание Bifidobacterium spp. уменьшалось на 2-4 порядка [10].

Энтеробактерии в экспериментальной группе были представлены эшерихиями в титре $4,99\pm0,17$ Log KOE/г, клебсиеллами — $4,81\pm0,12$ Log KOE/г, протеем (*Proteus mirabilis*) — $6,82\pm0,01$ Log KOE/г. Наращивание грамотрицательных энтеробактерий в кишечнике, основного источника эндотоксинов, описано в других исследованиях последствий алкогольной интоксикации [11, 12]. Среди грамположительных кокков отмечена тенденция к уменьшению фекальных стрептококков до 11,1% ($5,83\pm0,15$ Log KOE/г) в сравнении с контрольной группой, сапрофитные стафилококки к этанолу были нечувствительны.

Таким образом, в модельной системе хронической алкогольной интоксикации выявлено изменение структуры микробиоценоза кишечника крыс, выражающиеся в угнетении сахаролитической микрофлоры до 35 % и смещении количественного соотношения в сторону патогенной флоры *Proteus mirabilis, Klebsiella spp.* в сравнении с контрольной группой.

Морфологический анализ состояния печени при моделировании хронической алкогольной интоксикации. Гистологическое исследование биопсийного материала печени крыс-самцов, получавших 15 % этанол в качестве единственного источника жидкости в течение 40 дней, показало картину алкогольной диффузной жировой дистрофии. Окрашивание срезов биоптатов печени суданом III выявило наличие в цитоплазме гепатоцитов оранжевых липидных включений в виде капель, размеры которых варьировали от мельчайших пылевидных (пылевидная дистрофия) до мелких, средних и крупных размеров (мелко-, средне- и крупнокапельная дистрофия). Средне- и крупнокапельные липидные капли отмечались в синусоидных капиллярах, а также в центральной вене.

Окрашивание срезов биоптатов печени гематоксилином и эозином выявило изменения в ткани органа, характерные для хронического алкогольного гепатита. Отмечалась диффузная мелко- и среднекапельная жировая дистрофии ткани с характерными очагами гидропической дистрофии гепатоцитов в сочетании со среднекапельной жировой дистрофией печеночных клеток. В цитоплазме гепатоцитов выявлены включения, имеющие характерную гранулярную структуру — алкогольный гиалин, или тельца Маллори. Отмечались фокальные внутридольковые некрозы гепатоцитов, а также некрозы печеночных клеток, сконцентрированных вокруг сосудов — центральных вен, печеночных триад. Погибшие гепатоциты замещены воспалительными инфильтратами, что характерно для ступенчатого некроза. Воспалительная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация определялась внутри печеночных долек и в портальных трактах.

Электронно-микроскопические исследования биоптатов печени выявили изменения, характерные для токсического поражения клеток органа. Отмечено угнетение синтетической функции гепатоцитов и активизация процессов фиброобразования. Митохондриальный аппарат печеночных клеток представлен полиморфными структурами с уплотненным умеренно отечным матриксом и нечетко выраженными кристами.

Отмечалось расширение синусоидных капилляров и активация клеток, формирующих их стенку— звездчатых макрофагов, или клеток Купфера. Часть клеток имела вытянутую фибробластоподобную фор-

му, крупное гетерохромное ядро, вокруг которого концентрировались комплекс Гольджи, многочисленные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, единичные митохондрии, лизосомы, вакуоли. Другие клетки имели многочисленные цитоплазматические отростки, пересекающие просвет капилляра, крупные лизосомы и липидсодержащие капли, цистерны эндоплазматической сети (рис. 1 а, б). Данные клетки обладают высокой фибротической активностью, в местах их локализации наблюдалось расширение перисинусоидальных пространств и разрастание коллагеновых волокон (рис. 1 б). Очаги коллагенизации выявлялись в пространствах между печеночными пластинками гепатоцитов.

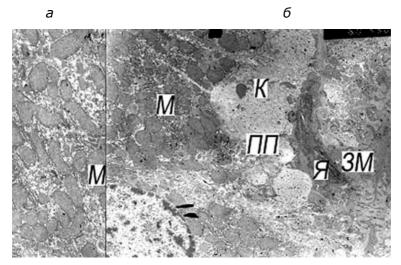


Рис. 1. Ультраструктурная организация клеток печени и синусоидного капилляра при хронической алкогольной интоксикации. Активированные звездчатые макрофаги в синусоидном капилляре (a, δ) ; расширение и коллагенизация пространства Диссе (δ) . 3M — звездчатый макрофаг, S — ядро, S — митохондрии, S — липидная капля, S — перисинусоидальное пространство (Диссе), S — коллаген. Увеличение микроскопа: S 8000 (a), S 6000 (б)

Эндотелиальная выстилка синусоидных капилляров на большем протяжении проницаема для клеток крови — активированные клетки лимфо- и моноцитарного ряда мигрируют в пространство Диссе. Отмечается окклюзия капилляров синусоидов клетками крови.

Таким образом, проведенное исследование показало, что поступление 15% раствора этанола в организм животных на протяжении 40 суток способствует развитию хронического алкогольного поражения печени, сопровождающегося диффузной жировой дистрофией органа, некрозом печеночных клеток и циррозом, метаболическими нарушениями и изменением структуры микробиоценоза кишечника крыс.

Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ М19-108 от 02.05.2019 г.

Список литературы

- 1. Мануйлов Б.М. Возможности фитотерапии при злоупотреблении алкоголя. М.: Медицина. 2005. 101с.
- 2. Некрасова Т.П. Морфологические особенности алкогольного поражения печени // Гепатологический форум. 2005. № 4. С.14—18.
- 3. Рослый И.М. и др. Биохимия и алкоголизм (IV): Типовые клинико-биохимические синдромы при хронической алкогольной интоксикации // Вопросы наркологии. 2004. №5. С.46—56.
- 4. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. М.: Издание Института мозга АМН СССР. 1976. 71 с.
- 5. Van de Wiel A. The effect of alcohol on postprandial and fasting triglycerides // Int J Vasc Med. 2012. Vol. 2012:862504.
- 6. Subbaiah G.V. et al. Ginger Treatment Ameliorates Alcohol-induced Myocardial Damage by Suppression of Hyperlipidemia and Cardiac Biomarkers in Rats // Pharmacogn Mag. 2017. Suppl 1. P. S69–S75.
- 7. Бохан Н.А., Иванова С.А. Окислительный стресс при алкоголизме: возможности метаболической коррекции на этапе формирования ремиссии // Наркология. 2010. № 10. С. 45–49.
- 8. Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Углеводный обмен, печень, алкоголь Пущино. 1988. 151 с.
- 9. Пронько Н.С. и др. Фолатзависимые механизмы гепатотоксичности этанола при хронической алкогольной интоксикации // Фундаментальные науки медицине. Минск. 2013. с.168.
- 10. Толкачев Б. Е. и др. Изменения кишечной микробиоты и биотрансформации ивабрадина у крыс при экспериментальной алкоголизации // Самарский научный вестник. 2017. Т. 6. № 3. С. 47–50.
- 11. Кнышова Л.П. и др. Влияние экспериментальной хронической эндогенной алкогольной интоксикации на микрофлору кишечника // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2016. № 4. С.40—44.

12. Яковлев А. Т. и др. Изменение микробиоты кишечника при хронической алкоголизации // Самарский научный вестник. 2017. Т.6. № 3. С.64-67.

УДК 577.115.083:577.24:616-053.1(470.67)

Магомедова М.А., Абдулнатипов А.И., Газимагомедова М.М. Дагестанский государственный медицинский университет, Махачкала madi 1975@bk.ru

Изменение уровня некоторых метаболитов углеводно-липидного метаболизма у подростков Дагестана в зависимости от природно-климатических условий

В статье проведен анализ динамики некоторых промежуточных метаболитов углеводно-липидного метаболизма в крови у подростков Дагестана в зависимости от природно-климатических условий. Полученные результаты исследований показывают практически неоднозначные изменения уровня изученных метаболитов в крови у подростков Дагестана в весенний и осенний периоды исследования.

Ключевые слова: глюкоза, гликоген, лактат, пируват, триглицериды, холестерин, подростки, экология.

Magomedova M.A., Abdulatipov A.I., Gazimagomedova M.M. Dagestan state medical University, Makhachkala

Changes in the level of certain metabolites of carbohydrate-lipid metabolism in Dagestan adolescents depending on natural and climatic conditions

The article analyzes the dynamics of some intermediate metabolites of carbohydrate-lipid metabolism in the blood of adolescents in Dagestan, depending on the natural and climatic conditions. The obtained research results show almost ambiguous changes in the level of the studied metabolites in the blood of Dagestan adolescents in the spring and autumn periods of the study.

Key words: glucose, glycogen, lactate, pyruvate, triglycerides, cholesterol, teenagers, ecology.

Исследованиями последних лет установлена тесная связь метаболических показателей периферической крови с характером и уров-

нем развития организма детей и подростков. Кроме того, в процессе роста и развития детей существенным критерием является согласованность их внутренних метаболических процессов, в свою очередь, направленных на поддержание внутреннего постоянства биологических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность организма в целом.

В связи с выше изложенным, изучение биохимических сторон функционирования организма, т.е. изучение метаболизма, углеводов, липидов, белков, имеет более весомое значение, поскольку в период роста и развития организма детей и подростков, проживающих в различных природно-климатических условиях, очевидно, происходят существенные изменения в морфо-функционально отношении. Соответственно, приспособление организма детей и подростков к различным природно-климатическим условиям в значительной степени, видимо, зависит от состояния не только белкового, но и углеводного липидного метаболизма [2,3,5,9].

В то же время результаты исследований в этом плане в Республике Дагестан практически отсутствуют. Исходя из этих предпосылок, нами были проведены системные исследования уровня некоторых метаболитов углеводно-липидного метаболизма в крови у подростков Дагестана, весной и осенью проживающих в условиях равнины. [2,3,4,9].

Объект исследований и условия проведения опытов. Объектом исследований были подростки, проживающие на равнине Дагестана, в возрасте 13, 14, 15, 16, 17 и 18 лет. Исследования проводили весной и осенью. Для проведения исследований в возрастном аспекте нами были подобраны по принципу аналогов (возраст, масса тела, рост и здоровье) 35 учеников в общем.

Методики биохимических анализов. Подготовка образцов для анализа. Образцы крови для проведения анализа метаболитов углеводно-липидного метаболизма стабилизировали гепарином, немедленно центрифугировали и слитую плазму хранили в морозильной камере для проведения анализов. Все анализы проводили в 3—4 крайности (параллелях). Определение уровня глюкозы в крови проводили глюкозооксидазным методом, модифицированным Абдулатиповым и Газаифаровым.

Концентрацию гликогена определяли по методу Pfleider; определение лактата в крови проводили по методу Gutmann L, Wohlefeld; определение пировиноградной кислоты в крови проводили по методике Fridemann Haugen, определение общих липидов проводили по методу Фолча; триглицеридов — по методу Ломбдида и Нейта в

модификации Покровского; неэстерифицированных жирных кислот — по методу Дитеиневе; холестерин — по методу Бухштейна [1,6,7,8].

Результаты исследований. Результаты исследования показывают неодинаковые изменения уровня (концентрации) изученных метаболитов углеводно-липидного (энергетического) метаболизма. В частности, эта неоднозначность проявляется в том, что содержание глюкозы в крови у подростков незначительно возрастает с 13 до 18 лет, т.е. в исследованные возрастные периоды в условиях равнины весной и осенью. Оно составляло 90.3 ± 1.9 мг% — в возрасте 13 лет, $110,3\pm2,1$ мг — в возрасте 18 лет в весенний период (таблица №1). В осенний период также отмечается аналогичное повышение содержания глюкозы в крови у подростков с 13 лет до 18 лет, и оно составляло $110,5\pm4,6$ мг% и $118,1\pm3,3$ мг%, соответственно, в исследованные возрастные периоды. Повышение концентрации глюкозы с 13 до 18 лет в крови у подростков незначительное. В осенний период исследования содержание глюкозы в крови у подростков незначительно выше в сравнении с весенним периодом.

Отмечаются аналогичные изменения содержания уровня гликогена в крови подростков в исследованные возрастные периоды. В частности, содержание гликогена в 13-летнем возрасте составляет $6,4\pm0,4$ мг/100 мл и весной $-9,7\pm0,8$ мл% в осенний период в крови у подростков. В последующие возрастные периоды отмечается значительное увеличение содержания гликогена в крови у подростков, и в 18-летнем возрасте оно составляет $18,0\pm0,3$ мг/100 мл и $18,5\pm0,5$ мг/100 мл весной и осенью соответственно.

Содержание молочной кислоты (лактат) в крови у подростков с 13 до 18 лет существенно увеличивается (таблица 1). Однако, наибольшее повышение уровня лактата отмечается в 15 и 17 лет. К 18-летнему возрасту содержание лактата также увеличивается и составляет $14.5\pm0.5~\text{мг}\%$ и $15.7\pm1.0~\text{мг}\%$ весной и осенью, соответственно. Следовательно, содержание лактата в крови у подростков Дагестана, проживающих на равнине весной и осенью, увеличилось практически в 2.5~разa.

Результаты исследований показывают практически равномерное увеличение концентрации пирувата в крови у подростков, проживающих на равнине в весенний и осенний периоды исследования. Наибольшее возрастание уровня пирувата в сыворотке крови у подростков отмечено к 17-летнему возрасту весной и осенью, и оно составило $0.67\pm0.04~\rm Mr\%$ и $0.59\pm0.02~\rm Mr\%$ соответственно (таблица 1).

Таблица 1. Изменение уровня некоторых метаболитов углеводнолипидного метаболизма у подростков Дагестана в зависимости от природно-климатических условий

	Возраст (лет)						
Показатели	13	14	15	17	18		
	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m		
Глюкоза, мг%	90.3±1,9	94,5±3,7	98,5±3,9	107,1±4,4	110,3±2,1		
	110,5±4,6	107,3±3,5	110,1±3,7	115,1±4,7	118,1±3,3		
Гликоген, мг/100мл	6,4±0,4	11,0±0,9	14,3±0,3	17,0±0,2	18,0±0,3		
	9,7±0,8	11,5±0,7	14,6±0,9	17,4±4,4	18,5±0,5		
Лактат, мг%	5,4±0,4	7,1±0,5	9,0±0,3	13,1±0,7	14,5±0,5		
	5,7±0,5	8,4±0,7	9,7±0,1	14,3±0,5	15,1±1,0		
Пируват, мг/100мл	0,35±0,01	0,57±0,03	0,60±0,03	0,67±0,04	0,61±0,5		
	0,3±0,01	0,54±0,03	0,57±0,1	0,59±0,02	0,71±0,01		
Общие ли- пиды, мг%	375,0±6,5	415,5±7,1	461,5±8,5	445,4±4,7	497,4±8,5		
	410,3±3,5	459,1±6,1	470,1±6,5	497,1±3,5	580,3±7,3		
Тригли- цериды, моль/л	1,19±0,04	1,38±0,04	1,43±0,05	1,47±0,08	1,57±0,07		
	1,25±0,01	1,37±0,06	1,47±0,01	1,53±0,03	1,65±0,04		
Холестерин, моль/л	3,9±0,1	4,3±0,4	4,6±0,5	5,3±0,6	5,6±0,6		
	4,1±0,2	4,6±0,3	4,8±0,4	5,5±0,7	5,9±0,8		
НЭЖК, мкэкв/л	481,3±11,3	495,1±14,1	431,1±9,5	470,3±13,5	495,5±9,4		
	527,3±14,3	509,4±13,4	539,4±8,6	550,1±11,5	581,4±8,7		

Примечание: в числителе — показатели весной, в знаменателе — осенью.

Полученные результаты исследования по определению уровня общих липидов крови у подростков показывают определенную закономерность в изменении их в исследованные возрастные периоды. Эта закономерность заключается в том, что в общем концентрация (уровень) общих липидов в крови у подростков Дагестана, проживающих на равнине наиболее низкая в возрасте 13 лет, и составляет $375,0\pm6,5$ мг% и $410,3\pm3,5$ мг% весной и осенью, соответственно. В последующие

возрастные периоды этот показатель значительно увеличивается и в 18-летнем возрасте составляет $497,4\pm8,5$ мг% и $580,3\pm7,3$ мг%, соответственно, в осенний и весенний период исследования (табл. 1).

Кроме того, содержание триглицеридов в крови у подростков за исследованные возрастные периоды повышается незначительно весной и осенью. В 18-летнем возрасте содержание триглицеридов в крови у подростков составляло $1,57\pm0,07$ ммоль/л и $1,25\pm0,01$ ммоль/л в весенний и осенний периоды исследования. Исследования показали, что содержание холестерина в крови у подростков увеличивается практически неравномерно с 13 до 18 лет. Однако, более существенное повышение (увеличение) уровня холестерина к 17-летнему возрасту, и составляет $5,3\pm0,6$ ммоль/л и $5,5\pm0,7$ ммоль/л весной и осенью, соответственно. В осенний период исследования уровень холестерина в крови у подростков незначительно выше в сравнении с весенним периодом. Эта закономерность наблюдается во все периоды исследования.

Содержание неэстерифицированных жирных кислот в крови у подростков в исследованные возрастные периоды изменяется менее существенно в сторону увеличения, как весной, так и осенью (табл. 1).

Содержание в крови таких метаболитов как глюкоза, гликоген, лактат, пируват, общие липиды, триглицериды, холестерин, НЭЖК, видимо, зависит от многочисленных факторов, в том числе от природно-климатических условий, что, в свою очередь, позволяет отнести их к более важным звеньям метаболизма углеводно-липидного метаболизма.

Анализируя полученные данные по определению глюкозы, гликогена, лактата, пирувата, общих липидов, триглицеридов, холестерина и свободных жирных кислот в крови у подростков Дагестана, проживающих на равнине, выявлены определенные закономерные изменения этих метаболитов в исследованные возрастные периоды, которые имеют важное значение как в научном, так и в прикладном отношении.

Список литературы

1. Абдулнатипов А.И., К определению глюкозы в крови глюкозооксидазным методом./ Абдулнатипов А.И, Газдаров В.М.//Бюллетень ВНИИ Физиологии, биохимии и питания сельско-хозяйственных животных, 1977г.- Вып.2.(45)- С.77-79.

- 2. Акименко А.К. Понятие об адаптации, ее критериях и механизмах адаптационного процесса/ А.К.Акименко// Адаптация личности в современном мире: межвузовский сборник научных трудов.- Саратов: Наука, 2011.- Вып.3.- С.5-18.
- 3. Величковский Б.Т. Рост и развитие детей и подростков России./ Б.Т.Величковский, А.А.Баранов, Р.В.Кучма// Вестник РАМН.-2004.- №1.- С.43-45.
- 4. Магомедова М.А. Региональные особенности физического развития детей и подростков Дагестана в период школьного обучения в зависимости от природно-климатических условий проживания/ М.А.Магомедов, Т.С.Гусейнов// Медицинский вестник Башкортостана- 2018.-№ 6(78).- Т.13.-С.20-22.
- 5. Яковлева Э.Б. Пубертатный период современные взгляды на проблему/ Э.Б.Яковлева, Н.Б.Касянова, О.А.Чурилова// Укр.мед. альманах. 2006. Т. 9. С. 163-164.
- 6. Folcher J, Simple method for the isolation and parification of total lipids from animal tissues,/ Folcher J, Lees M., Sloane Stanley G.A.// J.Biol.Chem 1957, -226, -P.497-509.
- 7. Frideman G. The determination of keto acidsin blood and urone/Frideman G., Haugen G.E. Purukie acid.// J.Bid Chem.-1943 v47 No 26- P.415-442.
- 8. Pfleicleres L. Methods of Enzymolie Analysis, Bergmeyez/ Pfleicleres L.// Acad Press №7 London, 1963 P.59-62.
- 9. Roger F. Soll. Individual Patient Meta-analysis in Pediatrics. Pediatrics 2011; 128:4 775-776; 19- 2011, doi:10.1542/ P.2011-2190.

УДК 61.612.8.04

Манасян А.Л.¹, Апрятин С.А.^{1,2}, Муртазина Р.З.², Клименко В.М.¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» , Санкт-Петербург Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет², Санкт-Петербург тапаsanartem 4@gmail.com

Поведенческие особенности самок крыс нокаутной линии TAAR9-KO

В статье дана оценка влияния нокаута рецептора TAAR9 на уровень тревожности и другие особенности поведения у крыс нокаутной линии TAAR9-KO. Данные физиологические параметры оценивались с помощью тестов «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».

Результаты исследования обработаны статистически с применением U-критерия Mанна-Yитни при p < 0.05.

Ключевые слова: TAAR9, следовые амины, рецепторы следовых аминов, открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт.

Manasyan A.L.¹, Apryatin S.A.^{1,2}, Murtazina R.Z.², Klimenko V.M.¹
Institute of Experimental Medicine¹
Saint Petersburg, Russia
Institute of Translational Biomedicine²,
Sainkt-Petersburg State University,
Saint Petersburg, Russia

Behavioral features of female TAAR9 knockout rats

This article estimated the effect of the TAAR9 knockout receptor on the hidden level of emotional anxiety and other behavioral features in rats of the TAAR9-KO line. These physiological parameters estimated by "Open field" and "Elevated plus maze" tests. The results of the study were statistically processed using the Mann-Whitney U-test at p < 0.05.

Key words: TAAR9, trace amines, trace amines receptors, open field test, elevated plus maze test.

Введение. Одной из главных проблем современного здравоохранения являются психоневрологические расстройства. По оценкам ВОЗ такого рода расстройства стали в мире одной из ведущих причин инвалидизации в мире. Современные фармакологические методы терапии психоневрологических расстройств клинически недостаточно эффективны и вызывают у пациентов тяжелые побочные последствия. В силу этого поиск новых мишеней для лекарственных средств является актуальной и важной проблемой современной психофармакологии. Рецепторы к следовым аминам стали одной из таких возможных мишеней.

Следовые амины — группа биогенных аминов, их присутствие в организме млекопитающих обнаруживают в чрезвычайно низких количествах ($\sim 100~\rm hr/r$ ткани) [1]. К следовым аминам относят фенилэтиламин, метокситирамин, фенилэтиламин, п-октопамин, п-тирамин, тиронамин, триптамин и др.

Рецепторы следовых аминов у млекопитающих были впервые описаны в 2001 г. двумя независимыми группами исследователей [7, 12]. Они принадлежат к 1 классу родопсиноподобных рецепторов, сопряженных с G-белком [10]. У человека, крыс и мышей различают 6 общих генов рецепторов следовых аминов (trace amine associated

гесертог, ТААR1, 2, 5, 6, 8 и 9), что позволяет использовать данные *in vivo* модели грызунов для глубокого изучения особенностей функционирования ЦНС. Наиболее изученным рецептором следовых аминов является ТААR1. Функции остальных пяти рецепторов на сегодняшний день изучены недостаточно. При помощи трансгенных моделей животных (в том числе с нокаутами генов семейства TAARs) *in vivo* моделируются различные заболевания нервной системы, включая шизофрению, болезнь Паркинсона, гиперактивность и другие [1, 6, 10]. В настоящее время эти модели широко используются в проведении доклинических исследований нейролептиков, антипсихотиков и других лекарственных препаратов [13].

Исследованный в данной работе рецептор ТААR9 экпрессируется в обонятельном эпителии, селезенке, кишечнике, спинном мозге и гипофизе [1]. На данный момент его функции и возможные лиганды неизвестны. Существуют также технические сложности определения расположения рецептора в клетке из-за недостаточной специфичности антител к ТААR9 и большинству других рецепторов семейства ТААRs. Для определения функций этого рецептора очевидно требуется проведение дальнейших физиологических и биохимических исследований на лабораторных животных, в том числе нокаутных по рецептору ТААR9.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния нокаута гена, кодирующего рецептор TAAR9, на поведенческие реакции крыс линии TAAR9-KO.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на самках крыс нокаутной линии TAAR9-KO возрастом 8-10 недель. Животные были разделены на 2 группы (WT — контрольная группа и TAAR9-KO — нокаут гена *TAAR9*) численностью по 6 особей в каждой. Подопытных крыс содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с действующими санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических вивариев.

Исследование горизонтальной и вертикальной локомоторной активности и показателей «норкового рефлекса» проводили в тесте «Открытое поле» (ОП). Уровень тревожности оценивали в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ).

Результаты исследования были обработаны статистически с применением стандартного статистического пакета программ Microsoft Office Excel 2016 и Statistica 16.0. Для оценки достоверности различий выборок использовался непараметрический ранговый U-критерий Манна—Уитни. За достоверное принимали различие при уровне вероятности 95% и более (p<0,05).

Результаты и обсуждение. Вертикальная двигательная активность крыс в тесте «Открытое поле» характеризуется двумя типами «вертикальных стоек». Первый: животные встают на задние лапы, а передние лапы упираются в стенку площадки («стойка с упором»), и второй: остаются на весу («стойка без упора»). Известно, что по этому показателю оценивают мотивационную (в том числе ориентировочно-исследовательскую) составляющую поведения подопытных животных. Это связано с тем, что, принимая вертикальное положение, грызуны пытаются войти в непрямой контакт с предметами, расположенными на расстоянии, проявляя исследовательскую активность [5].

Анализ результатов экспериментального исследования показал, что нокаут гена рецептора TAAR9 существенно влияет на поисковую активность животных.

Установлено, что число вертикальных стоек у крыс нокаутной линии ТААR9-КО было в среднем в 5 раз (p<0,05) больше, чем у крыс контрольной группы (рис. 1). По данным А. Ivinkis, количество вертикальных стоек, отражает исследовательскую активность, доминирование животного в популяции и степень его агрессивности [11]. Крысы нокаутной линии ТААR9-КО имели наибольшую вертикальную локомоторную активность, что указывает на повышенную поисковую активность данных особей по сравнению с крысами контрольной группы.

Также ориентировочно-исследовательское поведение подопытных крыс в тесте ОП было охарактеризовано с помощью оценки горизонтальной локомоторной активности в различных зонах арены. Число посещений центральной зоны поля свидетельствует об уровне тревожности животного — чем чаще животное выходит в центр площадки, тем меньше тревожность, и наоборот [1].

Были выявлены достоверные различия горизонтальной двигательной активности на периферии и в центре поля у нокаутных крыс. Крысы нокаутной линии TAAR9-KO свободно перемещались по всей площади поля, что свидетельствует о низком уровне тревожности, в то время, как крысы контрольной группы передвигались исключительно на периферии. Значения общей пройденной дистанции и средней скорости нокаутных по гену TAAR9 животных не отличались от показателей контрольной группы.

Одной из составляющих ориентировочно-исследовательского поведения крыс является «норковый рефлекс», который может являться важным показателем для исследования способности животных к нормальной или измененной поисковой активности. Обследование «норок» (отверстий, находящихся в полу арены открытого поля) представляет собой заглядывание крысы внутрь отверстия и/или об-

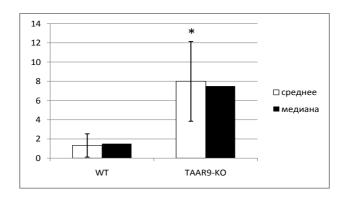


Рис. 1. Количество вертикальных стоек в тесте «Открытое поле». WT — контрольная группа, TAAR9-KO — экспериментальная группа. *p<0,05 Mann— Whitney U-test

нюхивание его краев [3]. Было выявлено, что у крыс нокаутной линии TAAR9-KO количество обследований превосходило аналогичный по-казатель у контроля в среднем в 3 раза (p < 0.05) (рис. 2).

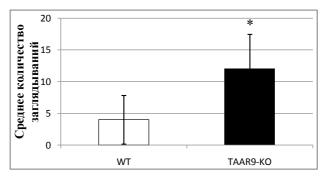


Рис. 2. Среднее количество заглядываний в «норки» в тесте «Открытое поле». WT- контрольная группа, TAAR9-KO — экспериментальная группа. *p $\leq 0,05$ Mann—Whitney U-test

При этом средняя продолжительность заглядывания крыс TAAR9-KO достоверно не отличалась от контрольной группы и равнялась $2,0\pm1,3$ сек (рис. 3).

Низкие средние значения времени заглядывания в сочетании с большим количеством актов заглядывания может говорить о том, что у крыс нокаутной линии TAAR9-KO наблюдается дефицит вни-

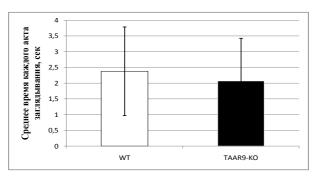


Рис. 3. Средняя продолжительность каждого акта заглядывания в секундах в тесте «Открытое поле». WT — контрольная группа, TAAR9-KO — экспериментальная группа

мания, который характеризуется неврологическо-поведенченскими расстройствами, связанными с нарушениями функции рецептора TAAR9 [2].

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» позволяет оценить степень тревожности, которая возникает чаще всего в результате стресса, вызванного помещением животного в новое место, а также освещением и открытым пространством [2, 4].

В тесте ПКЛ не обнаружено достоверных различий между поведением нокаутов и контрольной группы (рис. 4).

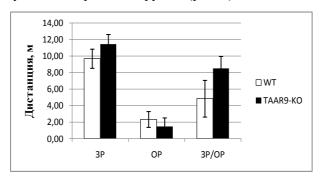


Рис. 4. Дистанция, пройденная в закрытых (3P) и открытых рукавах (OP), соотношение 3P/OP в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». WT — контрольная группа, TAAR9-KO— экспериментальная группа

Животные обеих исследуемых групп показывали близкое к естественному поведение, что проявлялось в увеличении времени их нахождения в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта.

Выводы. В тесте ОП показано достоверное увеличение локомоторной активности (как горизонтальной, так и вертикальной), а также количества актов «норкового рефлекса» у крыс нокаутной линии TAAR9 в сравнении с контрольной группой.

Повышенный «норковый рефлекс» у крыс TAAR9-КО сочетался с хаотичным обследованием норок при одинаковом с контрольными животными временем заглядывания, что может быть интерпретировано как снижение концентрации внимания, вызванное нарушениями функции рецептора TAAR9.

Не было обнаружено достоверных изменений в уровнях тревожности нокаутных по TAAR9 крыс в сравнении с контрольной группой.

Таким образом, в проведенном исследовании были выделены уникальные поведенческие особенности крыс нокаутной линии TAAR9-KO, характеризующиеся высоким уровнем поисковой активности, выражающейся в повышенной локомоторной активности и увеличенным количеством актов «норкового рефлекса» на фоне дефицита внимания.

Обнаруженные поведенческие изменения крыс нокаутной линии TAAR9-KO характеризуют возможную связь функционального нарушения рецептора следовых аминов TAAR9 с дофаминовыми системами, что, в свою очередь, приводит к повышению локомоторной активности и дефициту внимания у нокаутов, и требует проведения дальнейших физиологических и биохимических экспериментов.

Список литературы

- 1. Апрятин С.А., Карпенко М.Н., Муружева З.М., Большакова М.В., Магазенкова Д.Н., Клименко В.М. Нейродегенеративные и мета-болические нарушения, опосредованные следовыми аминами и их рецепторами // Медицинский академический журнал. 2020. 1. —
- 2. Быстрова М.Н., Демидова М.А., Гальчинская И.Л., Жолобов И.С. Исследование влияния различных лекарственных форм успокоительного сбора на поведение мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» // Современные проблемы науки и образования. -2012. -№2. -C. 25-28.

- 3. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Ноотропные и нейропротекторные средства // Экспериментальная и клиническая фармакология. -2007.-T.70.-N 4. -C.44-58.
- 4. Капышева У.Н., Бахтиярова Ш.К., Баимбетова А.К., Жаксымов Б.И., Корганбаева А.С. Влияние мононуклеаров на когнитивные функции в разные сроки после трансплантации // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 9. C. 279—283.
- 5. Маркель А.А., Хусаинов Р.А. Метод комплексной регистрации поведенческих и вегетативных реакций у крыс при проведении теста «открытое поле» // Высшая нервная деятельность. $1976 N_{\odot} 6. C. 1314-1318.$
- 6. Муртазина Р.Р., Гайнетдинов Р.Р. Трансгенные животные в экспериментальной фармакологии: фокус на рецепторах следовых аминов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2019. Vol. 105(11). P.1373—1380.
- 7. Borowsky B., Adham N., Jones K. A., et al. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98(16). P. 8966–8971.
- 8. Bunzow J. R., Sonders M. S., Arttamangkul S., et al. Amphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, Lysergic Acid Diethylamide, and Metabolites of the Catecholamine Neurotransmitters Are Agonists of a Rat Trace Amine Receptor // Molecular Pharmacology, Vol. 60.- No. 6.- P. 1181-1188.
- 9. Fisher, S. P., Black, S. W., Schwartz, M. D., et al. Longitudinal analysis of the electroencephalogram and sleep phenotype in the R6/2 mouse model of Huntington's disease // *Brain.* Vol. *1*36.— P. 2159—2172.
- 10. Gainetdinov R. R., Hoener M.C., Berry M.D. Trace Amines and Their Receptors // Pharmacol Rev. 2018. Vol. 70(3). P.549-620.
- 11. Ivinkis A. A. Study of validity of open-field measures // Austral.J.Psychol. 1970. Vol. 22. P.175–183.
- 12. Leo D., Gainetdinov R. R. Transgenic mouse models for ADHD // Cell Tissue Res. 2013. Vol. 354(1). P. 259–271.
- 13. Liberles S.D. Trace amine-associated receptors: Ligands, neural circuits, and behaviors // Curr. Opin. Neurobiol. 2015.— Vol.34.— P. 1–7.

УДК 616-092.18

Миронова К.А.¹, Бакурова Е.М.²

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк kseniya.chem@gmail.com¹, 32023@mail.ru²

Нарушение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках крови у пациентов с онкопатологией

Выявлено, что в эритроцитах больных как при РЛ, так и при РЖКТ активность Г6ФДГ изменялась в подгруппах достоверно, но разнонаправлено. В лимфоцитах достоверные изменения активности фермента наблюдались лишь во 2-й подгруппах исследуемых локализаций. Показатели активности Г6ФДГ эритроцитов позволили сформировать из общей когорты больных подгруппы с наиболее неблагоприятными изменениями их метаболизма. Поскольку нарушения специфичны лишь для эритроцитов, можем считать их прогностическим тестом развития синдрома старения эритрона.

Ключевые слова: рак, эритроциты, лимфоциты, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

Mironova K.A., Bakurova E.M.

«Donetsk National Medical University named after M. Gorky»,
Donetsk

Disorders of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in blood cells in patients with cancer

It was revealed that in erythrocytes of patients with both lung cancer (LC) and gastrointestinal cancer (GIC), the activity of G6PD changed significantly in the subgroups, but in different directions. In lymphocytes, significant changes of enzyme activity were observed only in the 2nd subgroup of the studied localizations. The erythrocyte G6PD activity indices allowed us to form subgroups from the general cohort of patients with the most unfavourable changes in their metabolism. Since the disorders are specific only to red blood cells, we can consider them a prognostic test for the development of the erythron aging syndrome.

Key words: cancer, red blood cells, lymphocytes, glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Актуальность темы. Развитие в организме злокачественной опухоли сопровождается не только местными изменениями, связан-

ными с нарушением ткани того или иного органа, но и общими изменениями в системе крови. Изменения в системе крови наиболее часто выражаются развитием анемии [1, 2], нейтрофильного или эозинофильного лейкоцитоза. Полагают, что наиболее часто анемия возникает при раке органов пищеварения и легких (Лаврова В.Н., 2011), ухудшая прогноз и эффективность лечения. Последнее связано с нарушением газотранспортой функции, сокращением жизненного цикла эритроцитов на фоне усиления прооксидантных процессов и развития энергодефицита [2-4]. Дисметаболические процессы в эритроцитах могут стать ранними предикторами данных осложнений, что позволит эффективнее проводить профилактику анемии.

Лимфоцит имеет сложный внутриклеточный обмен, отражающий практически все метаболические процессы [5-7], свойственные организму, поэтому в литературе он упоминается как «ферментативное зеркало организма».

К числу ключевых ферментов внутриклеточного метаболизма лимфоцитов и эритроцитов можно отнести глюкозо-6фосфатдегидрогеназу (ГбФДГ, КФ 1.1.1.49) – регуляторный фермент пентозофосфатного пути (ПФП), он играет важную роль в метаболизме глюкозы [2, 5, 8-10]. От этого фермента зависит путь деградации глюкозо-6-фосфата — гликолитический или пентозофосфатный. Биологическая роль ПФП состоит в том, что формируемые в нем рибозо-5-фосфат и НАДФН, используются в реакциях макромолекулярного синтеза: коферментов, нуклеиновых кислот, жирных кислот и т.д. Известно, что активность Г6ФДГ повышается в растущих и пролиферирующих клетках. Кроме того, Г6ФДГ взаимосвязана с ферментами антиоксидантной защиты (АОЗ) и катаболизма ксенобиотиков. Имеется кофакторная связь Г6ФДГ с глутатионредуктазой, поддерживающей восстановление глутатиона, необходимого для работы АОЗ эритроцита. Помимо этого, Г6ФДГ – поставщик водорода для НАДФН-оксидазы, генерирующей активные формы кислорода, необходимые для проявления бактерицидного действия лейкопитов.

Цель исследования: установить особенности активности Г6ФДГ в эритроцитах и лимфоцитах у пациентов с распространенными формами рака различных локализаций.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования было выбрано три группы больных с опухолями желудочно-кишечного тракта и легких. Обследовано 102 человека в возрасте от 40 до 70 лет с I-IV стадией рака. Контрольную группу составили 30

практически здоровых лиц идентичного возраста. Выделение клеток из крови доноров провели методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина (BoyumA., 1968). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — по скорости восстановления НАДФН₂,который регистрировался спектрофотометрическина СФ-46 (Ломо, Россия) при длине волны 366 нм. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы «Statistica 10.0» Statsoft. Для проверки распределения данных на нормальность использовался критерий Шапиро-Уилка. Описание выборок производили с помощью подсчета медианы (Ме), ошибки медианы (m) и интерквартильного размаха в виде 25 (С25) и 75 (С75) процентилей (Ме±т; С25-С75). Корреляционный анализ проводился с помощью критерия ранговой корреляции Спирмена. Сравнение центральных тенденций двух независимых выборок оценивали по W-критерию Вилкоксона.

Результаты. Достоверных изменений активности Г6ФДГ эритроцитовв зависимости от стадии заболевания не было выявлено (Ro=0, p>0,05). Не было установлено зависимости ферментативной активности от локализации рака в желудке (PЖ) или кишечнике (PK), поэтому в дальнейшем были выделены две группы больных. В первую вошли больные РЛ, а во вторую наиболее близкие две локализации — РЖ и РК (РЖКТ).

В то же время, кластерный анализ абсолютных значений ферментативной активности в данном исследовании показал их неоднородность, выделив в каждой группе по два кластера. Были выделены две группы: 1-я — основная и 2-я. Впервые подгруппы, со статистически установленной повышенной активностью Г6ФДГ, включены эритроциты 40 больных РЖ и РК (59% в группе РЖКТ) и эритроциты 18 пациентов с РЛ (53% в группе РЛ). Во вторых подгруппах исследуемых локализаций рака активность Г6ФДГ эритроцитов была ниже контроля и активности первых подгрупп. В эти подгруппы включены эритроциты 28 больных РЖ и РК (41%) и 16 пациентов с РЛ (47% от всей выборки для РЛ).

Результаты исследования приведены в табл. 1. В эритроцитах больных РЛ и РЖКТ активность $\Gamma 6\Phi Д\Gamma$ изменялась в подгруппах достоверно, но разнонаправлено. Так при РЛ и РЖКТ в эритроцитах их первых подгрупп активность фермента увеличена по сравнению с контролем в 2 и 3,5 раза соответственно (p<0,001). Во 2-х подруппах активность $\Gamma 6\Phi Д\Gamma$ наоборот понижена, при РЛ в 2,2 раза (p<0,001), а при РЖКТ в 1,6 раз (p=0,020).

Повышение Г6ФДГ, свидетельствует об интенсификации работы ПФП окисления глюкозо-6-фосфата, повышении потребности клеток в метаболитах этого пути. Метаболиты ПФП на этапе образования глицеральдегид-3-фосфата могут включаться в другие метаболические пути – например гликолиз и синтез липидов. В эритроцитах глицеральдегид-3-фосфат может утилизироваться гликолитически с образованием 1,3-дифосфоглицерата или регуляторной молекулы 2,3-дифосфоглицерата. Также можно полагать, что в первыхподгруппах больных наблюдается компенсаторное усиление функционирования ПФП и продукции НАДФН, для восстановления глутатиона, метгемоглобина и стабилизации клеточной мембраны эритроцитов в условиях активации прооксидантных процессов. Во вторых подгруппах различных локализаций пониженная активность Г6ФДГ эритроцитов может отражать наиболее неблагоприятные последствия дефицита НАДФН2, в частности, снижение эффективности глутатионзависимых реакций АОЗ, нарушение детоксикации перекиси. При активации СРО происходит окисление цистеина вбелковойчасти гемоглобина, в результате чего протомеры гемоглобина, соединяясь дисульфидными мостиками, образуюттельца Хайнца. Последние, как известно, снижают пластичность клеточной мембраны эритроцитов, которые при деформации в капиллярах разрушаются. Понижение активности фермента связывают со старением эритроцита. Некоторые авторы взаимосвязывают инактивацию Г6ФДГ с окислительной модификацией цистеина в ее активном центре [11-13].

Анализируя результаты активности лимфоцитарной $\Gamma 6\Phi \Lambda \Gamma$, было установлено, что в 1-х подгруппах при РЛ и РЖКТ активность фермента не отличалась от контрольной величины (табл. 1). Во 2-х подгруппах активность фермента увеличена, по сравнению с контролем, при РЛ в 3 раза, а при РЖКТ — в 1,5 раза (р<0,001). Повышение активности Γ -6- $\Phi \Lambda \Gamma$ у больных раком различных локализаций отражает усиление активности АОЗ, по-видимому, указывает на функциональное напряжение адаптивных и защитных систем в лимфоцитах.

Выводы. Ферментативная активность в разных клетках крови при различной локализации рака имеет схожий характер изменений. Установленные изменения активности Г6ФДГ, в каждом индивидуальном случае демонстрируют, что в отличие от лимфоцитов в эритроцитах дисметаболические процессы развиваются быстрее. Снижение активности Г6ФДГ в эритроцитах может быть связано с их дисфункцией.

Может быть специфическим фактором развития синдрома старения эритрона, а затем — анемии.

Таблица 1. Активность Γ -6- Φ Д Γ в клетках крови при раке различной локализации (Me \pm m)

Активность	V	РЛ		РЖКТ	
Г-6-ФДГ	Контроль	I(n=18)	II (n=16)	I (n=40)	II (n=28)
Эритроциты, нмоль/мин/мг	0,10±0,01(0,05- 0,13)	0,16±0,06 (0,12-0,37) p<0,001	0,04±0,01 (0,032-0,07) p=0,006	0,32±0,06 (0,17-0,51) p<0,001	0,06±0,01 (0,03-0,08) p=0,020
Лимфоци- ты, нмоль/ мин*10 ⁶ клеток	0,22±0,01 (0,19-0,25)	0,25±0,04 (0,12-0,30) p>0,05	0,60±0,11 (0,28-0,71) p<0,001	0,20±0,01 (0,16-0,24) p>0,05	0,28-0,07 (0,21-0,50) p<0,001

Список литературы

- 1. Рывкин А.И. К патогенезу анемии при рахите у детей //Медицинский альманах. № 2 (32), 2014. С. 114-117.
- 2. Чумакова С. П., Уразова О. И., Зима А. П., Новицкий В. В. Особенности физиологии эритроцитов. Гемолиз и эриптоз // Гематология и трансфузиология. 2018. С. 343-351. DOI 10.25837/ HAT.2019.51.80.003
- 3. Жуков В.И., Перепадя С.В. и др. Оксидантно-антиоксидантные взаимодействия и структурно-функциональное состояние плазматических мембран у больных раком прямой кишки. // Вісник проблем біології і медицини. 2010. Вип. С. 116-120.
- 4. Киселев О.И., Сергеева И.В., и др. Структурно-метаболические характеристики клеток и их функциональные возможности //Эпидемиология и инфекционные болезни, Т. 20, №5, 2015. С. 52-56.
- 5. Yang Z, Shen Y, Oishi H. Et al. Restoring oxidant signaling suppresses proarthritogenic T cell effector functions in rheumatoid arthritis. SciTranslMed. 2016 Mar 23;8(331):331ra38. doi: 10.1126/scitranslmed. aad7151.
- 6. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Зуков Р.А., Толмачева Т.В. Ферментный спектр лимфоцитов периферической крови у больных почечно-клеточным раком до и после хирургического лечения // Медицинская иммунология. Т. 20, № 3, 2018. С. 391-400.
- 7. Савченко А.А., Лапешин П.В., Дыхно Ю.А. Особенности иммунного статуса и активность метаболических ферментов лимфоцитов крови в зависимости от стадии рака легкого // Российский биотерапевтический журнал. №3, Том 3, 2004. С. 19-23.

- 8. Asadi P, Vessal M, Khorsand M, Takhshid MA. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and risk of gestational diabetes. J Diabetes MetabDisord. 2019 Nov 27;18(2):533-541. doi: 10.1007/s40200-019-00464-5.
- 9. Francis RO, D'Alessandro A, Eisenberger A. Et.al. Donor glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases blood quality for transfusion. J Clin Invest. 2020 Jan 21.pii: 133530. doi: 10.1172/JCI133530.
- 10. Redhu AK, Bhat JP. Mitochondrial glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenaseabrogate p53 induced apoptosis in a yeast model: Possible implications for apoptosis resistance in cancer cells. BiochimBiophysActa Gen Subj. 2020 Mar;1864(3):129504. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.129504.
- 11. Коношенко С.В., Мартоян М.М., Елкина Н.М., Мирмуминова З.М. Окислительная модификация протеинов и метгемоглобинобразование в эритроцитах в условиях моделирования окислительного стресса invitro//Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Том 4 (70). 2018. № 1. С. 35–42.
- 12. Обухова Л.М., Ерлыкина Е.И., Копытова Т.В. Белки плазмы крови и свободнорадикальная активность при злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей//Вестник Удмурского университета Т. 27, вып. 3. 2017. С. 381-385.
- 13. ТузееваА.Ю., Генинг Т.П., Долгова Д.Р. Окислительная модификация белков в эритроцитах и плазме крови в динамике экспериментального рака яичников // Ульяновский медико-биологический журнал. № 4, 2014. С. 76-79.

УДК 577.1

Мирошникова Е.Б. ¹, Дадали Ю.В.², Дадали В.А.², Галебская Л.В. ¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Министерства здравоохранения России ¹, ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Министерства здравоохранения России²,

Санкт-Петербург

К вопросу о влиянии некоторых соединений фенольной природы на стабильность биомембран в модели фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов: I. Сравнение эффектов коэнзима Q_{10} и мексидола

На модели фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов показан мембраностабилизирующий эффект «свободного», не связанного в молекулярный комплекс с β-цДКС убихинола в области концентраций

от 0 до 1.0·10-3 моль/л, тогда как для окисленной формы — убихинона (оксидант) наблюдается мембранодестабилизирующий эффект, аналогичный эффектам антиоксидантов мексидола и эмоксипина. Вероятно, мембранодестабилизирующее действие последних может быть обусловлено иными, неантиоксидантными механизмами.

Ключевые слова: антиоксидант, фотоиндуцированный гемолиз, эритроциты, фотосенсибилизатор радахлорин, убихинон, убихинол, мексидол.

Miroshnikova E.B.¹, Dadali Y.V.², Dadali V.A.², Galebskaya L.V.¹

On the influence of some phenolic compounds on the stability of biomembranes in the model of photoinduced hemolysis of red blood cells:

I. Comparison of the effects of coenzyme Q₁₀ and Mexidol

On the base of photoindused erytrocites hemolysis model it was demonstrated membrane stabilizing effect of non bounded with β -cyclodextrin («free») ubiquinol in concentrations $0-10^{-3}$ mol / l. But its oxidised form — ubiquinon (that is oxidant) develops destabilizing effect that is the same for the antioxidants mexidol and emoxipin. Probably destabilizing effect of mexidol is determinded by its nonantioxidant properties.

Key words: antioxidant, photoinduced hemolysis, red blood cells, photosensitizer Radachlorin, ubiquinone, ubiquinol, mexidol.

Актуальность. Фотосенсибилизированное окисление липидов мембран клеток, широко применяемое в фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований, может быть смоделировано фотосенсибилизированным гемолизом мембран эритроцитов. Это позволяет подойти к изучению возможных механизмов воздействия различных веществ и поиску соединений, обладающих в режиме фотогемолиза мембраностабилизирующим действием.

Ранее в работах [1—3] рассмотрено влияние двух антиоксидантов — производных 3-оксипиридина — 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (мексидола) и 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина гидрохлорида (эмоксипина), отличающихся только природой аниона, на параметры фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов. В [3] изучали действие мексидола в его терапевтических дозах, т.е. в достаточно узком диапазоне концентраций. Для лучшего понимания характера действия этих соединений диапазон концентраций был существенно расширен [1]: от 2.5·10⁻⁷ до 2.5·10⁻³ моль/л. При действии каждого из них в концентрациях от 0 до 2.5·10⁻⁴ моль/л

наблюдался мембраностабилизирующий эффект с узким максимумом защитного действия . В то же время в широком диапазоне их концентраций (от 10^{-5} до 10^{-3} моль/л) [2] обнаружен значимый мембранодестабилизирующий эффект и усиление гемолиза эритроцитов [1]. Можно предполагать, что наблюдаемые эффекты связаны не только с их антиоксидантными свойствами, но и иными механизмами действия, обусловленными химической структурой. Поэтому представляется важным рассмотреть в рамках предложенной модели влияние на стабильность мембран эритроцитов и других соединений фенольной природы, как обладающих антиоксидантной активностью, так и не обладающих ею. В этом плане предложено изучить действие редокс-пары коэнзима \mathbf{Q}_{10} , т.е. двух его форм — восстановленной (убихинола), обладающей антиоксидантными свойствами, и окисленной формы (убихинона), заведомо не имеющей антиоксидантной активности.

Цель исследования: сравнительное изучение мембраностабилизирующего действия восстановленной и окисленной форм коэнзима Q_{10} (убихинола и убихинона) на основе параметров модели фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов и сравнение их действия с эффектами мексидола и эмоксипина.

Материалы и методы исследования. В работе исследовалась свежая цитратная кровь человека. Получение эритроцитов, подготовку инкубационной смеси и исследуемых растворов, их обработку лазерным излучением при $\lambda = 653$ нм, исследование кинетики гемолиза проводили так же, как описано в [1]. Для исследований высоко гидрофобных убихинола и убихинона и увеличение их растворимости в воде использовали изначально приготовленные водорастворимые молекулярные комплексы включения обоих соединений в молекулу гидроксипропил-β-циклодекстрина (β-цДКС) по типу «хозяингость», либо каждое из соединений растворяли в солюбилизаторе Tween-80 (ПАВ). Измерение величины оптической плотности и регистрацию кинетической кривой их гемолиза проводили при 800 нм на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ЛОМО», СПб, Россия) в течение всего периода времени T_{Total} , необходимого для протекания полного гемолиза. О степени разрушения (убыли) эритроцитов, скорости их гемолиза в пробах судили по рассеянию света на эритроцитах, т.е. уменьшению значений величины оптической плотности при 800 нм от времени t. По регистрируемой кинетической (гемолитической) кривой, имеющей близкий к S-образному характер, с помощью программного обеспечения СФ-2000 определяли основные параметры фотоиндуцированного гемолиза: 1) период времени T_{50} (или $T_{1/2}$) полуразрушения эритроцитов при их гемолизе наполовину, т.е. от завершения облучения до лизиса 50% эритроцитов инкубационной смеси [1]; 2) а также период полного гемолиза эритроцитов T_{Total} — от завершения облучения до лизиса 100% эритроцитов и выхода кривой на насыщение. Величина $T_{1/2}$ находится в обратной зависимости от скорости гемолитического процесса.

Результаты и их обсуждение. Редокс-пара исследуемого эндогенного коэнзима Q_{10} представляет собой две его формы — восстановленную (убихинол), обладающую антиоксидантными свойствами, и окисленную (убихинон), заведомо не обладающую таковыми (рис. 1).

$$\begin{array}{c} CH_3O \\ CH_3O \\ CH_3O \\ CH_2 \\ CH_2 \\ CH_2 \\ CH_3 \\ CH_3O \\ CH_$$

Рис. 1. Химическая структура окисленной (Q_{10}) и восстановленной (H_2Q_{10}) форм редокс-пары коэнзима Q_{10}

Хемилюминесцентным методом в условиях цепного инициированного окисления при 60°C (инициатор азобис-изобутиронитрил (АИБН)) в воде показано, что как свободный, так и связанный в комплекс с β -цДКС убихинон (окисленная форма коэнзима Q_{10}) не обладают какой-либо антиоксидантной активностью в отношении динамически образующихся пероксирадикалов инициатора АИБН. В то же время, как и следовало ожидать, восстановленная форма коэнзима Q_{10} обладает высокой антиоксидантной активностью по отношению к пероксирадикалам АИБН в тех же условиях цепного инициированного окисления АИБН. При этом свободный, не связанный в комплекс, убихинол проявляет в ~9.85 раз более высокую антиоксидантную активность (79.1 сек/мкмоль л-1), чем его водорастворимый молекулярный комплекс включения в β -цДКС (8.03 сек/мкмоль·л⁻¹). Такое значительное (~10 раз) уменьшение окисляемости убихинола в комплексе с гидроксипропил-β-циклодекстрином по сравнению со свободным убихинолом является подтверждением связывания убихинола H_2Q_{10} и экранированием в молекулярном комплексе его активных гидроксильных групп, ответственных за антиоксидантную активность. Тем самым, в модели фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов от свободного убихинола следовало бы ожидать более сильного, связанного с антиоксидантным мембранозащитного эффекта, чем от убихинола, связанного в молекулярный комплекс с β -цДКС.

С целью обнаружения влияния на гемолиз эритроцитов восстановленной (убихинол) и окисленной (убихинон) форм коэнзима Q_{10} нами проведены кинетические измерения расходования эритроцитов в процессе гемолиза и оценки по этим кривым величины $T_{1/2}$ периода полуразрушения (гемолиза наполовину) в области концентраций $1.0\cdot10^{-5}-1.5\cdot10^{-3}$ моль/л. Для этого при 800 нм измеряли оптическую плотность рабочих растворов приготовленных проб в зависимости от времени, и по уменьшению значения этой величины оптической плотности (соответствующего оптического рассеяния света на эритроцитах) судили об уменьшении содержания эритроцитов в пробе, скорости гемолиза и эффективности мембранозащитного эффекта каждой из форм коэнзима Q_{10} .

Вид полученных кинетических кривых разрушения эритроцитов в ходе гемолиза как для комплекса убихинол — β -цДКС, так и комплекса убихинон — β -цДКС, аналогичен полученным ранее [1] для мексидола и эмоксипина. Построенные по этим кривым зависимости величины $T_{1/2}$ периода полуразрушения от концентрации убихинола (убихинона) приведены на рис.2.

На зависимости $T_{1/2}$ от концентрации убихинона (рис. 2a) видно значимое уменьшение величины $T_{1/2}$ по сравнению с контрольными опытами. Это означает увеличение мембраноразрушающего эффекта комплекса убихинон — β -иДКС во всей области от 0 до 10^{-3} моль/л. Таким образом, как и можно было ожидать, действие убихинона как окисленной формы коэнзима Q_{10} , не обладающей антиоксидантной активностью, закономерно приводит к усилению мембраноразрушающего эффекта.

В то же время для комплекса убихинол (восстановленная форма коэнзима Q_{10}) — β -цДКС, обладающего антиоксидантной активностью, наблюдается монотонное увеличение значений $T_{I/2}$ во всей области концентраций убихинола от 0 до 10^{-3} моль/л по сравнению с контрольными опытами (рис. 2б). Таким образом, обнаружено небольшое (до 5-6 минут от контроля по $T_{I/2}$) монотонное возрастание мембраностабилизирующего эффекта связанного в комплекс убихинола H_2Q_{10} .

Вероятно, небольшое наблюдаемое значение по величине ингибирующего эффекта на гемолиз эритроцитов связано с экранировкой активных химических групп убихинола при его встраивании в β-цДКС. При этом можно было бы ожидать и гораздо большего

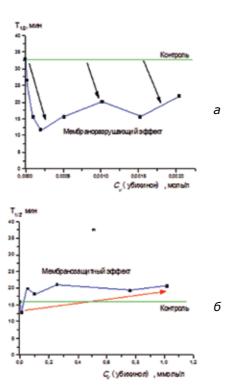


Рис. 2. Зависимости величины $T_1/^2$ полупревращения эритроцитов при их гемолизе в зависимости от концентрации Cv: а) связанного в комплекс с β -цДКС убихинона в интервале от $2.03 \cdot 10^{-5}$ до $1.52 \cdot 10^{-3}$ моль/л; б) связанного в комплекс с β -цДКС убихинола в интервале от $1.02 \cdot 10^{-5}$ до $1.02 \cdot 10^{-3}$ моль/л

мембраностабилизирующего эффекта «свободного», т.е. не связанного в комплекс «хозяин — гость» убихинола как восстановленной формы коэнзима Q_{10} .

С целью проверки этого предположения в качестве солюбилизатора для растворения убихинола в буферных растворах и исследования его в модели фотоиндуцированного гемолиза использовали ПАВ Тween-80. На рис. 3 приведён характерный вид регистрируемых кинетических кривых гемолиза эритроцитов в изучаемой модельной системе. Кривые имеют достаточно сложный, но монотонно убывающий характер, что является отражением самого процесса гемолиза, т.е. разрушения мембран клеток эритроцитов в течение времени.

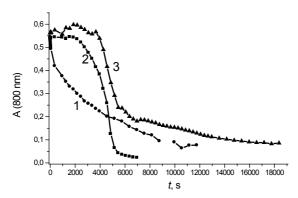


Рис. 3. Характерный вид кинетических кривых гемолиза эритроцитов: 1-в отсутствие убихинола в пробе (контрольный опыт); 2- солюбилизатор Tween-80 в пробе в отсутствие убихинола (холостой опыт); 3-в присутствии убихинола, растворенного в Tween-80, концентрация убихинола в пробе $7.23\cdot10^{-4}$ моль/л

Из рис. 3 видно, что кривые 2 и 3 имеют S-образный вид нисходящих кривых с начальным «плато» видимой задержки гемолиза, что может быть связано с протеканием наряду с гемолизом процесса образования дополнительных дисперсных частиц, увеличивающего светорассеяние при 800 нм. Причём наличие «плато» на кривой 2 (холостой опыт), где отсутствует коэнзим Q_{10} , — прямое свидетельство дополнительного образования дисперсных частиц в результате взаимодействия ПАВ Тween-80 с ионами буферного раствора. Существенное ускорение гемолиза при действии Тween-80 (рис. 3, кривая 2) объясняется развитием процесса разрушения мембран действием поверхностно-активных сил Tween-80. Подобный характер имеют все кинетические кривые гемолиза, полученные во всём изучаемом диапазоне концентраций убихинола в Twin-80 в пробах от 1.45·10⁻ 5 моль/л до $0.96 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Во всех опытах, где присутствуют растворённые в Tween-80 убихинон и убихинол, наблюдается «плато», численно выражаемое величиной индукционного периода видимой задержки гемолиза, одинаковой для всех опытов (36 мин). Наблюдаемый индукционный период, связанный с действием используемого для растворения коэнзима Q_{10} вспомогательного поверхностно-активного компонента смеси Tween-80, вычитали при обработке всех кинетических кривых.

Полученные концентрационные зависимости величины $T_{1/2}$ действия солюбилизированного Tween-80 убихинола на скорость гемолиза эритроцитов в изучаемой системе представлены на рис. 4а, где

индукционный период с Tween-80 видимой задержки гемолиза, составляющий постоянную величину 36 мин, суммирован с общим эффектом убихинола, а также — на разностной зависимости (рис. 4б), где этот период вычитается.

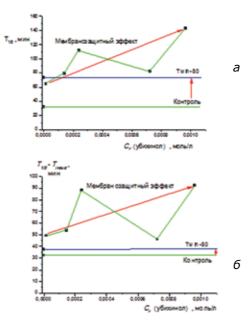


Рис. 4. Зависимости величины $T_{1/2}$ полуразрушения эритроцитов при их гемолизе от концентрации C_{ν} убихинола в интервале от $1.45\cdot 10^{-5}$ до $1.0\cdot 10^{-3}$ моль/л: а) с индукционным периодом от Tween-80; б) с вычетом индукционного периода от Tween-80, т.е. $(T_{1/2}-T_{induct})$

Из рис. 4а видно, что во всём диапазоне концентраций C_{ν} убихинола вплоть до $1.0\cdot 10^{-3}$ моль/л наблюдается значимый возрастающий интегральный (с индукционным периодом от Tween-80) ингибирующий эффект «свободного» убихинола H_2Q_{10} на процесс гемолиза эритроцитов, характеризующийся значением величины $T_{1/2} \sim 80$ минут при $1.0\cdot 10^{-3}$ моль/л. После вычитания индукционного периода в опытах с Tween-80 также во всём диапазоне концентраций убихинола наблюдается значимый возрастающий ингибирующий эффект «свободного» убихинола H_2Q_{10} на процесс гемолиза эритроцитов, характеризующийся значением величины ($T_{1/2}-T_{induct}$) ~ 45 минут при $1.0\cdot 10^{-3}$ моль/л (рис. 46).

Тем самым в широком интервале концентраций убихинола от $1.45\cdot 10^{-5}$ моль/л до $1.0\cdot 10^{-3}$ моль/л наблюдается существенное увеличение величины периода полуразрушения эритроцитов $T_{I/2}$ по сравнению с контрольным опытом (стрелка вверх), что указывает на возрастание мембраностабилизирующего эффекта, и, вероятно, связано с антиоксидантным действием убихинола. Таким образом, в наблюдаемый в условиях растворения (солюбилизации) убихинола в Tween-80 ингибирующий эффект значительно превосходит (в ~ 9 раз) эффект убихинола, включённого в молекулярный комплекс с β -цДКС, что, как и опытах с АИБН, связано с экранированием ОН-групп бензольного кольца убихинола. Результаты, полученные по полному периоду времени T_{Total} разрушения эритроцитов в ходе гемолиза, подтверждают ещё более существенный и возрастающий мембранозащитный эффект убихинола (до 95 минут с вычетом индукционного периода от Tween-80).

Таким образом, мембранозащитный эффект убихинола в модели фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов значительно превышает мембранозащитный эффект мексидола и эмоксипина, которые проявляют свои антиоксидантные свойства лишь в узкой, ограниченной области малых концентраций от 0 до $2.96 \cdot 10^{-5}$ или $2.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л [1]. Во всём остальном, более широком интервале концентраций, при действии этих соединений наблюдалось ускорение гемолиза эритроцитов, подобное окисленной форме коэнзима Q_{10} . Действительно, не обладающий антиоксидантными убихинон, проявляет ускоряющее процесс гемолиза действие даже в своей экранированной в β-цДКС форме. Очевидно, что аналогичное разрушающее эритроциты действие мексидола и эмоксипина едва ли связано с их антиокислительными свойствами, а, скорее – с иными механизмами действия этих соединений, требующими дополнительного изучения, поскольку структуры их молекул содержат пиридиновое, а не фенильное кольцо, как у убихинола, обладающего как антиоксидантными, так и ингибирующими гемолиз свойствами.

Выводы.

- 1. На модели фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов обнаружен деструктурирующий эффект окисленной формы коэнзима Q_{10} (убихинона) и мембраностабилизирующий эффект его восстановленной формы (убихинола) в комплекс с β -цДКС.
- 2. Обнаружен значимый мембраностабилизирующий эффект «свободного», не связанного в молекулярный комплекс с β -цДКС убихинола, значительно превышающий мембранозащитный эффект мексидола и эмоксипина в широкой области концентраций от 0 до $1.0\cdot10^{-3}$ моль/л.

3. Показано, что обнаруженное ранее в [1, 3] ускорение гемолиза эритроцитов при действии мексидола и эмоксипина в широкой области концентраций может быть объяснено не антиоксидантными механизмами, а, вероятно, иными механизмами, связанными с отличием их химической структуры от структуры молекулы убихинола.

Список литературы

- 1. Мирошникова Е. Б., Дадали Ю.В., Дадали В.А., Галебская Л.В. Изучение влияния некоторых соединений фенольной природы на стабильность биомембран в модели фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов. // В сборнике научных трудов Всероссийской научнопрактической конференции с Международным участием «Профилактическая медицина. Часть 2». Санкт-Петербург, 2018. С. 138 143.
- 2. Галебская Л.В., Соловцова И.Л., Соловьева М.А., Заммоева Д.А., Кузьменков А.Н. Сравнение фотодинамического эффекта в отношении эритроцитов человека и кролика.//Ж. эволюционной биохимии и физиологии. 2011. Т. 47, № 3. С. 219-222.
- 3. Галебская Л.В., Соловцова И.Л., Мирошникова Е.Б., Сушкин М.А., Разумный А.В. Парадоксальный эффект антиоксиданта в системе фотоиндуцированного гемолиза.// Вестник СПбГУ. Серия «Медицина» 2016. -Т.3, №11. С.95-102.

УДК 612.392.98

Мухамеджанов Э.К., Лю М.Б.

AO «Научный центр противоинфекционных препаратов» Алматы, Казахстан labpharma@mail.ru

Биохимические основы развития метаболического синдрома

Аннотация. Диабет, ожирение и сердечно-сосудистые растройства по широте распространения приняли масштаб эпидемии неинфекционного происхождения. Эти заболевания являются основной причиной высокой заболеваемости и смертности человека. Хотя эти заболевания в основном обусловлены нарушением энергетического гомеостаза, однако метаболические основы их патогенеза до конца не выяснены, что обуславливает постоянное увеличение уровня их распространения. В данном сообщении разбираются механизмы развития метаболического синдрома и предлагаются пути по профилактике и лечению.

Ключевые слова: метаболический синдром, патогенез, профилактика, лечение

> Mukhamejanov E.K., Lyu M.B. JSC «Scientific Center for Anti-infectious Drugs» Almaty

Biochemical basis of the metabolic syndrome development

Annotation. Diabetes, obesity and cardiovascular disorders by breadth of distribution accepted the scale of epidemics of non-infectious origin. These diseases are the main cause of high human morbidity and mortality. Although these diseases are basically conditioned by a violation of energy homeostasis, however, the metabolic bases of their pathogenesis are not fully understood, which causes a constant increase in the level of their distribution. In this report, the mechanisms of the metabolic syndrome development are analyzed and ways of prevention and treatment are proposed.

Key words: metabolic syndrome, pathogenesis, prevention, treatment

По данным ВОЗ метаболический синдром (МС) в 2012 году составил 60% смертности и 43% заболеваемости, а в 2020 году по их прогнозу уже составит 73% смертности и 60% заболеваемости. Вот такая безрадостная перспектива в основном обусловлена недостаточным пониманием патогенеза МС. В механизме развития МС большое значение придают генетическим факторам, стилю жизни современного человека, однако основной причиной в настоящее время считается нарушение гомеостаза глюкозы, которая обусловлена развитием инсулин резистентности (ИР).

Концентрация глюкозы в крови зависит от количества поступления с пищей и величиной ее использования на физическую деятельность, поэтому все технологии по борьбе с МС связаны с рекомендациями по питанию и физической деятельности. Хотя это вполне обоснованные рекомендации, но человек довольно «слабое» существо и ему хочется вкусно поесть и полежать на диванчике, поэтому количество лиц с МС ежегодно только увеличивается и все надеяться, что врачи изобретут «чудо» таблетку, которая бы позволяла человеку не прибегать к изнурительным диетам и физическим нагрузкам. В свое время нами была предложена такая чудо таблетки в виде сульфатированного полисахарида бурых морских водорослей фукоидана [1].

Основным потребителем глюкозы под влиянием инсулина являются скелетные мышцы (2). Однако с возрастом происходит сниже-

ние мышечной массы (саркопения), поэтому в маленькую мышцу даже под влиянием инсулина поступает намного меньше глюкозы (рис. 1).

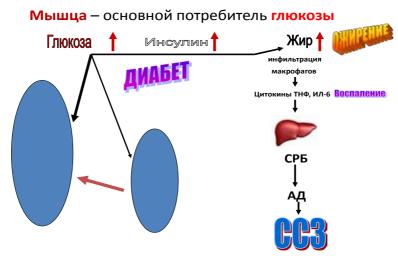


Рис. 1. Влияние саркопении на развитие хронических неинфекционных заболеваний

Поэтому происходит увеличение концентрации глюкозы в крови (маркер диабета). Под влиянием глюкозы происходит стимуляция секреции инсулина и отмечается развитие инсулинемии (маркер диабета). Другими словами, снижение величины мышечной массы является важной причиной развития диабета (первого компонента МС).

Под влиянием инсулина активируется сброс углеродного скелета в липиды (липогенез), что приводит к развитию дислипидемии (второго компонента МС). Активация липогенеза способствует усилению отложения липидов в адипоцитах и развивается ожирение (третий компонент МС).

Жировая ткань в настоящее время приравнивается к эндокринному органу, так как она способствует секреции биологически активных соединений. Из-за быстрого размножения адипоцитов развиваются проявления недостаточного образования капилляров или развивается гипоксия. Это способствует инфилитрации в адипоциты макрофагов и стимулирется секреция воспалительных цитокинов (ФНО, ИЛ-6) или развиваются проявления воспаления. Поэтому диабет и ожире-

ние относятся к заболеваниям вялотекущего хронического воспаления [3]. Поэтому на фоне воспаления коронавируса оказывает более сильное негативное проявление.

Воспалительные цитокины поступают в печень, и она секретирует С-реактивный белок, который способствует повышению артериального давления и отмечается развитие гипертонии (четвертого компонента МС).

Действительно, если в диете снижается содержание углеводов или увеличивается их утилизация на физическую активность отмечается уменьшения проявлений МС, хотя эти технологии широко рекомендуются всеми врачами, но основная масса больных хочет получить лекарственные препараты. Однако для их разработки необходимо разобраться в патогенезе развития МС, что, несомненно, во многом может помочь врачам разработать эффективные технологии по профилактике и лечению МС.

Обычно к терапии каждого компонента МС подходят по симптоматике, тогда как надо использовать таргетную (по механизму действия) терапию. Надо в первую очередь использовать имеющиеся технологии по увеличению мышечной массы. Мышцы — это белок, поэтому необходимо адекватное поступление белка и желательно полноценного. С возрастом снижается уровень половых гормонов. Так у мужчин уровень тестостерона снижается на 30% [4], что способствует развитию анаболической резистентности, поэтому пожилым лицам требуется на 30% и больше белка. Однако существует мнение, что с возрастом надо снизить потребления белка для снижения азотистого отравления, но исследования не подтверждают такого мнения [5].

Сильное анаболическое влияние оказывает физическая нагрузка, особенно резистентная [6]. При этом следует использовать гипоксические технологии, так как гипоксия способствует усилению синтеза белка [7]. Рекомендуется назначать прием анаболических аминокислот — лейцина, валина, изолейцина, которые в спортивной практике называются ВСАА. Следует также назначать витамины ($\mathbf{B_1}$ и Д) и микроэлементы (Са и Мг), которые способствуют улучшению процесса синтеза белка [8]. Возможна также заместительная гормональная терапия тестостероном для мужчин и эстрогенами у женщин.

Таким образом, уточнения биохимических основ развития МС позволяет по-новому подойти к проблеме разработки таргетных подходов в отношении разработки технологий по профилактике и лечению МС.

Список литературы

- 1. E.Mukhamejanov, G.Kon, S.Erjanova, A.Kirgizbaeva, E.Muhamadieva Fucoidan New Principle Prevention and Treatment of Diabetes Journal of Pharmacy and Pharmacology.-2019.-V.7.-P.316-322
- 2. A.S.Deshmukh Proteomics of Skeletal Muscle: Focus on Insulin Resistance and Exercise Biology Proteomes.-2016.-V.4 (1) Feb 4
- 3. Heilbronn L.K., Campbell L.V. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. Curr Pharm Des.-2008.-V.14.-P.1225-1230
- 4. A.A.Abbasi, P.J.Drinka, D.E.Mattson, D.Rudman Low Circulating Levels of Insulin-Like Growth Factors and Testosterone in Chronically Institutionalized Elderly Men J Am Geriatr Soc.-1993.-V.41.-P.975-982
- 5. Devries M.C., Sithamparapillai A., Brimble K.S., Banfield L., Morton R.W., Phillips S.M. Changes in kidney function do not differ between healthy adults consuming higher- compared with lower- or normal-protein diets: a systematic review and meta-analysis. J Nutr.-2018.-V.148.-P.1760-1775
- 6. Dunstan D.W., Daly R.M., Owen N., Jolley D., De Courten M., Shaw J., Zimmet P. High-intensity resistance training improves glycemic control in older patients with type 2 diabetes. Diabetes Care.-2002.-V.25.-P.1729-1736
- 7. Gamboa J.L., Garcia-Cazarin M.L., Andrade F.H. Chronic hypoxia increases insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.-2011.-V.300.-P.R85-R91
- 8. A.Reitman, I.Friedrich, A.Ben-Amotz, Yishai Levy Low Plasma Antioxidants and Normal Plasma B Vitamins and Homocysteine in Patients With Severe Obesity Isr Med Assoc J.-2002.-V.4.-P.590-593

УДК 613.2.038

Мухамеджанов Э.К., Айтынова А.Е., Ерджанова С.С. AO «Научный центр противоинфекционных препаратов» Алматы, Казахстан labpharma@mail.ru

Роль биохимии в развитии науки о питании

Питание — это многостадийный процесс ассимиляции и диссимиляции пищевых соединений, поэтому выяснение особенностей протекания биохимических реакций в процессе усвоения пищевых соединений является основой для разработки принципов сбалансированного питания. Все процессы в организме имеют определенную цикличность, поэтому нами

была разработана модель взаимосвязи между обменом белков, жиров и углеводов в зависимости от фаз жизнедеятельности человека (цикл кормление — голодание), что позволило разобраться в механизме развития (патогенезе) обменных заболеваниях и разработать диетические принципы их профилактики и лечения.

Ключевые слова: биохимия, питание, модель взаимосвязи, обменные заболевания

Mukhamejanov E.K., Aitynova A.E., Erjanova C.C. «JSC cientific Center for Anti-infectious Drugs» Almaty

Role of biochemistry in development of food science

Nutrition — is a multi-stage process of assimilation and dissimilation of food compounds, therefore, clarification of the course of biochemical reactions characteristics in the process of food compounds assimilation is the basis for the development of the balanced nutrition principles. All processes in the body have a certain cyclicality, therefore, we have developed a model of the relationship between exchange of proteins, fats and carbohydrates, depending on the phases of human life (feeding — fasting cycle), which made it possible to understand the mechanism of development (pathogenesis) of metabolic diseases and develop their dietary principles. prevention and treatment.

Key words: biochemistry, nutrition, model of relationship, metabolic diseases

Питание является важнейшим аспектом поддержания жизнедеятельности, поэтому вопросам сбалансированного питания уделяется особое внимание. Обычно при разработке принципов сбалансированного питания учитываются принципы гигиены питания — адекватность и безопасность. Хотя эти аспекты, несомненно, очень важны, но фактически отсутствуют работы по вопросам биохимии питания, поэтому в данном сообщении мы остановимся на этих аспектах.

Биохимия настолько сложный предмет, что она очень плохо дается и быстро забывается. Если просто посмотреть на метаболические карты, то даже специалистам сложно в них разобраться, а врачи до сих пор не понимают, зачем для их практической деятельности надо выучивать и разбираться в тысячах метаболических превращений. Для упрощения понимания биохимии нами разработана концептуальная модель взаимосвязи между обменом белков, жиров и углеводов в зависимости от транспорта углеродного скелета и этапах взаимосвязи между процессами образования и утилизации АТФ при использовании экзогенных и эндогенных пищевых потоков (рис. 1).

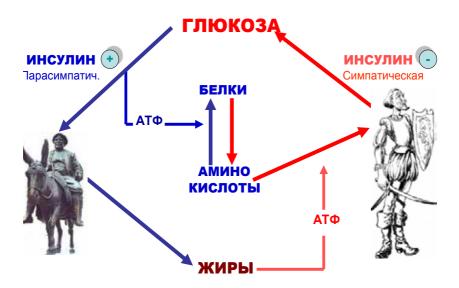


Рис. 1. Модель взаимосвязи между обменом белков, жиров и углеводов при использовании экзогенных (синие стрелки) и эндогенных (красные стрелки) пищевых потоков

Наверху модели находится глюкоза, в связи с ее ключевой ролью в энергетическом обеспечении процессов жизнедеятельности. В центре модели поставлены белки, которые способствуют координации обмена углеводов и жиров, а внизу модели находятся жиры, которые являются буферной системы при избыточном поступлении энергетических источников.

После приема пищи (абсорбтивный период) происходит активация парасимпатического отдела нервной системы и секреция гормона инсулина, что способствует активации двух анаболических процессов (синтез белка и липидов). Процесс синтеза белка может осуществляться только при протекании сопутствующего катаболического процесса (окисления глюкозы) обеспечивающий процесс синтеза белка энергией АТФ. Поэтому между процессом синтеза белка и окислением глюкозы выявляется корреляционная зависимость на уровне образования и утилизации энергии АТФ.

При недостаточном содержании в рационе питания углеводов снижается обеспеченность анаболического процесса в АТФ и умень-

шается включение аминокислот, что ведет к их накоплению (гипераминоацидемия). Напротив, при дефиците белка в диете снижается обеспеченность процесса синтеза белка в субстрате, поэтому снижается потребность в АТФ, что ведет к ингибированию процесса утилизации и окисления глюкозы и происходит увеличение концентрации глюкозы в крови (гипергликемия). Следовательно, при не соответствии рациона по содержанию углеводов и белков развиваются метаболические нарушения, которые могут способствовать развитию функциональных нарушений. Следует отметить, что несоответствие между потоками могут возникать в зависимости от метаболических характеристик человека, экологических факторов окружающей среды и климатических особенностей региона.

В этом случае можно использовать несложный биохимический скрининг. Дать завтрак со стандартным содержанием белков, жиров и углеводов и через 30-60 мин провести оценку глюкозу и аминокислот в крови. Если для данного индивидуума выявляются проявления гипераминоцидемии, то для него в рационе не хватает углеводов или высокий уровень белка, что можно легко корригировать. Если же отмечается проявления гипергликемии, то надо сделать обратные изменения — снизить содержание углеводов или повысить количества белка в рационе. Таким путем можно разработать персонифицированный подход для создания сбалансированного питания.

Перед следующим приемом пищи (постабсорбтивный период) обеспечение процессов жизнедеятельности в глюкозе осуществляется за счет ее эндогенных запасов и глюконеогенеза. В крови человека содержится около 4 г глюкозы [1], тогда как головной мозг за сутки потребляет более 100 г. У нас есть депо гликогена в печени, которое может обеспечить почти половину суточной потребности мозга в глюкозе. Однако при использовании гликогена печени освобождающиеся место замещается жирами (первая стадия цирроза печени). Хотя этот процесс обратимый, но при нарушении питания он может стать необратимым. В мышечной ткани содержится около 300 г гликогена, но в ней нет фермента глюкозо-6-фосфатазы, поэтому гликоген мышц не может служить источником для глюкозы крови и используется только на нужды самой мышцы.

В этих случаях гомеостаз глюкозы может поддерживаться только за счет процесса глюконеогенеза, но в качестве субстрата для этого процесса используются аминокислоты, поэтому в постабсорбтивный период усиливается катаболизм белка, а в энергетическом аспекте процесс глюконеогенеза обеспечивается за счет АТФ образующейся в результате окисления жиров. На этом этапе также выявляется взаи-

мосвязь между образованием АТФ (окисление жиров) и ее использованием (глюконеогенез). У обычного человека количество утилизируемых жиров почти в семь раз превышают утилизируемые белковые запасы. Поэтому при голодании быстрее кончается запас утилизируемого бека и, соответственно, количества субстрата для глюконеогенеза. Это приводит к уменьшению потребности в энергии АТФ, что ведет к ингибированию окисления жиров на уровне ацетил-КоА. Снижение окисления ацетил-КоА активирует процесс его конденсации в ацетоацетат, далее идет его восстановление в оксибутират и ацетон, т.е. активируется кетогенез. Этот процесс особенно активно протекает при диабете 1 типа, когда может возникать кетонная кома и гибель больного. Обычно в этих случаях дают инсулин, который блокирует окисление липидов и тем самым предотвращается развитие кетоза. Однако кетоз можно устранить и посредством приема ключевой глюконеогенной аминокислоты аланин, что способствует увеличению потребности и тем самым блокируется процесс конденсации ацтил-КоА и снимается кетоз. Поэтому в экстренных случаях при отсутствии инсулина можно воспользоваться приемом аланина в дозах 5 г (физиологическая норма потребности) и выше. В крайних случаях можно использовать моносахарид фруктозу, которая также может служить субстратом для глюконеогенеза.

Чем дольше происходит голодание или чем сильнее мы проводим редукцию рациона питания, тем интенсивнее происходит утилизация функциональных белков для обеспечения субстратом процесса глюконеогенеза и тем сильнее развиваются различные функциональные нарушения. В первую очередь организм использует самые «малоценные» белки (мышечные белки), но это ведет к развитию мышечной слабости. Далее начинают использоваться белки крови, с которыми происходит транспорт пищевых соединений, что ведет к развитию эндогенной пищевой недостаточности. Затем происходит утилизация клеток крови (лейкоциты, лимфоциты), которые отвечают за иммунный ответ, что ведет к понижению иммунитета и развитию инфекций. В последствии происходит ухудшение деятельности органов, нарушение адаптации и при потере 70% азота происходит гибель организма. Очень часто в клинической практике для уменьшения развития функциональных нарушений вводят больного в медикаментозную кому. В этих случаях уменьшается потребность мозга в глюкозе, что способствует уменьшению развития функциональных нарушений.

Все теории сбалансированного питания направлены на коррекцию абсорбтивного периода, но как-то в стороне остались проблемы

несоответствия эндогенных источников характеру жизни современного человека. Ранее нами была опубликована статья [2] и разработан специализированный продукт для питания тучных лиц, направленный на коррекцию эндогенного пищевого потока. На этот продукт был получен английский патент.

Таким образом, уточнение биохимических основ протекания процессов обмена веществ и выяснение патогенеза развития метаболических нарушений является наиболее эффективным путем сохранения здоровья и работоспособности человека и разработки адекватных методов профилактики и лечения обменных заболеваний.

Список литературы

- 1. D.H.Wasserman Four Grams of Glucose Am J Physiol Endocrinol Metab.-2009.-V.296.-P.E11-E21
- 2. E.K.Mukhamejanov, A.K.Kulnasarov, S.S.Erdjanova "Two Pyramids Two Products Phase Nutrition New Model Nutrition of Humans". EC Nutrition.-2019.-V.14.-P.114-119

УДК 577.218:616.36

Мухаммадиева Г.Ф., Хуснутдинова Н.Ю., Валова Я.В., Зиатдинова М.М., Репина Э.Ф., Каримов Д.О., Якупова Т.Г.

> ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Уфа ufniimt@mail.ru

Изменение профиля экспрессии гена *Sod1* при индуцированном токсическом гепатите

В статье представлен анализ экспрессии гена Sod1 в печени крыс на фоне развития токсического поражения, вызванного введением тетрахлорметана. Работа выполнена на самцах беспородных белых крыс, которые были разделены на 3 группы: контрольную и 2 опытные. Полученные результаты продемонстрировали различия в уровне экспрессии гена Sod1 между исследуемыми группами животных при интоксикации тетрахлометаном.

Ключевые слова: токсический гепатит, тетрахлорметан, экспрессия гена.

Mukhammadiyeva G.F., Khusnutdinova N.Yu., Valova Ya.V., Ziatdinova M.M., Repina E.F., Karimov D.O., Yakupova T.G.

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology Ufa

Changes in the Sod1 Gene Expression Profile in Induced Toxic Hepatitis

The article presents an analysis of the expression of the Sod1 gene in rat liver against the background of the development of toxic damage caused by the introduction of carbon tetrachloride. The work was performed on male outbred white rats, which were divided into 3 groups: control and 2 experimental. The results obtained demonstrated differences in the level of expression of the Sod1 gene between the studied groups of animals under carbon tetrachloride intoxication.

Key words: toxic hepatitis, carbon tetrachloride, gene expression.

Применение химических веществ на многих производственных объектах, безмерное использование медикаментов и бытовой химии, потребление алкогольной продукции обуславливает возникновение различных патологических процессов. Нейтрализация токсических веществ осуществляется преимущественно в печени. Основной формой патологии, вызываемой токсическими факторами, является химическое поражение печени [2]. Существенную роль в развитии данного состояния играет оксидативное повреждение печени активными формами кислорода [1, 5]. Известно, что формированию окислительного стресса способствует воздействие тетрахлорметана (ТХМ), который наиболее часто применяют при экспериментальном моделировании токсического гепатита у животных.

Важнейшим элементом антиоксидантной защиты организма являются супероксиддисмутазы — семейство металлсодержащих белков, метаболизирующих супероксидные радикалы. Фермент купроэнзим цитозоля Cu/Zn-супероксиддисмутаза (COQ1), кодируемый геном Sod1, принимает участие антиокислительном ответе клеток и обеспечивает защиту от токсичности активных форм кислорода. Он содержится в основном в цитоплазме клеток, но был найден также в межмембранном пространстве митохондрий печени крыс [4].

Целью работы явилось исследование экспрессии гена *Sod1* в печени крыс на фоне развития токсического поражения, вызванного введением ТХМ.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на самцах беспородных белых крыс (n=21) массой 170-190 г., которые были разделены на 3 группы по 7 животных в каждой: первую группу составили контрольные животные, не подвергавшиеся химическому воздействию; вторую и третью — крысы, которым подкожно вводили 50% масляный раствор ТХМ в дозе 2 г/кг массы тела и подвергали исследованию спустя 24 и 72 ч соответственно. Для анализа экспрессии гена Sod1 выделяли тотальную РНК из образцов печени крыс применяя реактив ExtractRNA (3AO «Евроген», Россия), проводили обратную транскрипцию, и использовали праймеры фирмы 3AO «Евроген». ПЦР осуществляли в режиме реального времени на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия). В качестве референсного был взят ген Gapdh. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

Результаты анализа, показывающие изменение профиля гена *Sod1* в печени крыс при введении ТХМ, представлены на рис. 1.

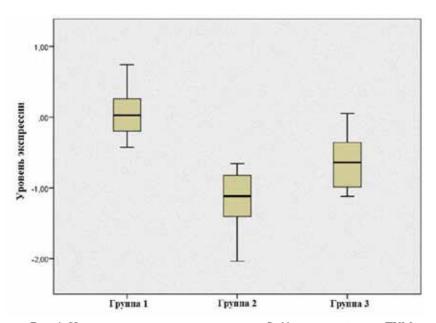


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии гена *Sod1* при воздействии ТХМ

Как видно из приведенных данных, между изучаемыми группами животных выявлены статистически значимые различия (F=18,38; p<0,0001). Так, при введении животным ТХМ через 24 ч отмечалось значительное снижение транскрипционной активности гена Sod1 (-1,18±0,18) по сравнению с контрольной группой (p=0,0001). Вместе с тем через 72 ч наблюдалось увеличение содержания мРНК исследуемого гена (-0,63±0,16), но эти изменения оказались статистически незначимыми (p=0,060). Полученные данные позволяют предположить, что при индуцированном ТХМ окислительном стрессе происходит истощение антиоксидантной системы. Есть сведения, что изменение активности ферментов антиоксидатной системы вызывает повышение окислительного стресса, которое ведет к увеличению уровня окислительного повреждения клеточных макромолекул и измененному ответу на стресс [3].

Полученные в рамках данного исследования результаты продемонстрировали различия в уровне экспрессии гена *Sod1* между исследуемыми группами животных при интоксикации ТХМ. Выявленные изменения требуют, однако, дальнейшего изучения для понимания молекулярных механизмов токсического поражения печени, а также потенциального использования в качестве диагностических и прогностических маркеров.

Исследование выполнено при поддержке гранта Республики Башкортостан молодым ученым от 07.02.2020 г. № УГ-43 «О присуждении в 2020 году грантов Республики Башкортостан молодым ученым».

Список литературы

- 1. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. 343 с.
- 2. Черешнев В.А., Мышкин В.А., Еникеев Д.А. Гепатопротекция при химических воздействиях. М.-Уфа: Полиграфдизайн, 2012. 201 с.
- 3. Lee J., Koo N., Min D.B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals // Compr Rev Food Sci Food Saf. 2004. Vol. 3, Nolemn 1. P. 21-33.
- 4. Okado-Matsumoto A., Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria // J Biol Chem. 2001. Vol. 276, № 42. P. 38388-38393.
- 5. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases / S. Li, H.Y. Tan, N. Wang et al. // Int J Mol Sci. 2015. Vol. 16, N 11. P. 26087-26124.

УДК 616-006.04+615.003

Плехова Н.Г.¹, Степанюгина А.К.², Коршунова О.В.¹, Черненко И.Н.², Шевченко О.В.^{1,3,4,5}, Апанасевич В.И.⁶

Центральная научно-исследовательская лаборатория Тихоокеанского государственного медицинского университета¹,

Тихоокеанский государственный медицинский университет², Академический департамент ядерных технологий Дальневосточного федерального университета³,

Лаборатория молекулярной фармакологии и биомедицины Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН⁴, Инженерно-технологический центр Института химии ДВО РАН⁵, Институт хирургии Тихоокеанского медицинского университета⁶, Владивосток, Россия pl_nat@hotmail.com

Фотосенсибилизатор хлорофиллин как перспективное лечебное средство для фотодинамической терапии при онкологии

Проведено изучение противоопухолевой активности хлорофиллин натриевой соли из биологически активной добавки «ОХҮхлорофилл». Исследовано накопление вещества в клетках, цитотоксические свойства и определена их жизнеспособность. Полученные данные на модели опухоли Эрлиха демонстрируют эффективность «ОХҮхлорофилла» при пероральном приеме.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, хлорофиллин, противоопухолевая активность, фотодинамическая терапия.

Plekhova N.G.¹, Stepanyugina A.K.², Korshunova O.V.¹, Chernenko I.N.², Shevchenko O.V.^{1,3,4,5}, Apanasevich V.I.⁶

Central Research Laboratory of the Pacific State Medical University¹,
Pacific State Medical University²,

Academic Department of Nuclear Technology of Far Eastern Federal University³,

Laboratory of Molecular Pharmacology and Biomedicine Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS⁴,

Engineering and Technology Center of the Institute of Chemistry FEB RAS⁵,
Institute of Surgery Pacific State Medical University⁶,
Vladivostok, Russia

Photosensitizer chlorophyllin as a promising therapeutic agent for photodynamic therapy in oncology

The study of the antitumor activity of sodium chlorophyllin salt from the biologically active additive «OXYchlorophyll» was carried out. The accumulation

of the substance in cells was investigated, the cytotoxic properties and viability were determined. The data obtained on the Ehrlich tumor model demonstrate the effectiveness of «OXY chlorophyll» when taken orally.

Key words: photosensitizer, chlorophyllin, antitumor activity, photodynamic therapy.

Активные субстанции эффективных фотосенсибилизаторов (ФС) второго поколения нерастворимы в водной среде и их применение в качестве терапевтического средства в фотодинамической терапии (ФДТ) сопряжено с использованием определенных фармакологических форм. Способность ФС селективно накапливаться в патологических тканях и при воздействии света определенной длины волны, генерировать синглетный кислород и/или кислородсодержащие свободные радикалы, обуславливает гибель патологических клеток. Водорастворимая форма натриевой соли хлорофиллина (смесь безметальных производных) по структуре подобна гематопорфирину и способствует ингибированию неспецифической активности цитохрома Р450 [1-3]. Хлорофиллин избирательно накапливается в патологических клетках и тканях, воздействует на цитохром Р450 и обладает антиоксидантными и противоопухолевыми свойствами. Щелочная соль медных комплексов, которую получают путем омыления экстрактов хлорофилла из люцерны, включает порфириновое кольцо с атомом меди в центре, который координационно связан с атомами азота. Атомы металла, включенные в форбинное кольцо металлопорфирина, придают молекуле способность к образованию смешанных комплексных соединений, экстралигандов [3]. Также, введение в молекулу производного хлорофилла атома меди повышает его биологическою активность, в том числе противовоспалительную и противоопухолевую. В свою очередь, химическое родство хлорофилла с гемоглобином открывает широкие перспективы использования подобных препаратов в медицине. Цель настоящего исследования: определение противоопухолевой эффективности «ОХУхлорофилла».

Эксперименты по изучению противоопухолевого эффекта ФС проведены на мышах гибридах F1 (CBA+ C57|B6), самцах весом 20—21 г, с перевитой внутрибрюшинно карциномой Эрлиха (рак молочной железы, 1905; асцитный вариант 1932 г.) в дозе 5×10⁶ клеток/мл. Исследовали эффективность биологически активной добавки «ОХҮхлорофилл» (активная субстанция хлорофиллин 340 мг в 100 мл) и ее компонентов: хлорофиллин, мальтодекстрин, содержащий сорбат калия на основе очищенной воды и хлорин Е6. При условии формирования опухоли Эрлиха через 10 дней животные были рас-

пределены на 5 групп: контрольные, без приема препарата (1 группа), и экспериментальные, которые перорально ежедневно принимали мальтодекстрин (15 мг/кг, 2 группа), Хлорин Еб (3-10 мг/кг, 3 группа), хлорофиллин (15 мг/кг, 4 группа), «ОХҮхлорофилл» (4,8 мг/кг, 5 группа). Прием веществ животными осуществлялся ежедневно через поилку с водой. Забор асцитного материала для цитологических исследований производили через 1, 3, 7 и 14 дней после начала приема препаратов. Результаты эксперимента оценивали по продолжительности жизни в группах и характеру морфологических изменений в опухолевых клетках.

Изучение накопления Φ С в клетках проводили с помощью проточного цитофлуориметра MACSQuant TMAnalyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия), в качестве источника возбуждения использовали аргоновый лазер с длиной волны 405 нм (W = 20 мВт). Интенсивность флуоресценции измеряли в спектре возбуждения хлоринов (λ =720 нм). В каждом временном интервале рассчитывали среднее значение интенсивности флуоресценции клеток с помощью программы «Kaluza 1» (Beckman Coulter, США).

Определение жизнеспособности клеток проводили по состоянию проницаемости мембран для акридинового оранжевого (АО, 250 нг/мкл, Sigma-Aldrich, США) на основе 0.1 М цитратного буфера (рН 6.0), включавшего 1 mM ЭДТА-Nа, 0.15М NaCl, 0.2М NaPO4 и 1 мг/мл альбумина (Sigma-Aldrich, США). Через 15 мин окрашенные клетки суспензировали и анализировали на проточном цитофлуориметре с определением малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, бокового светорассеяния (SSC), характеризующего цитоплазматические и мембранные особенности клеток. Также проводили регистрацию флуоресценции клеток при длинах волн эмиссии 525 нм и 585 нм с введением в программу анализа коэффициента компенсации. Измерение включения клетками АО проводили на одинаковом количестве образцов, пять показателей на одну временную точку.

Цитотоксичность определяли с помощью теста на включение клет-ками метилтиазолилтетразолия (МТТ). Для чего к монослою клеток вносили раствор, содержащий 2 мг/мл МТТ (3-[4,5-диметилтиазолил-2]-2,5-дифенил тетразолиум бромида, Sigma-Aldrich, США) на основе фосфатного буфера (рН 7,2) с 0,4% MnCl₂, инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Клетки с включенными гранулами диформазана разрушали путем внесения 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0,04 M HCl, в течение 20 мин с инкубацией на термошейкере («BioRad», США) при 37°C и измеряли оптическую плотность суб-

стратов на иммунологическом анализаторе «Multiskan FC» (Thermo Fisher Scientific, Финляндия) при длине волны 540 нм. Измерение включения клетками МТТ проводили на одинаковом количестве образцов, пять показателей на одну временную точку. Результаты спектрофотометрического анализа выражали в виде индекса стимуляции (Т, %), который вычисляли как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции клеток после контакта с образцами и без (контроль) него, к среднему показателю оптической плотности раствора интактных клеток, контроль принят за 0.

При определенных условиях способность НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктазных ферментов, в частности сукцинатдегидрогеназ (СДГ), восстанавливать МТТ в нерастворимые гранулы формазана сопровождает функциональную активность клеток. Установлено, что в начальный период наблюдения (12 ч) наблюдалось понижение показателей активности СДГ, что указывало на цитотоксическое действие изучаемых образцов. В дальнейшем внутриклеточное содержание гранул формазана нарастало, что отражало повышение метаболической активности, связанное с пролиферацией клеток. При этом максимальные показатели (р<0,05) обнаруживались в отношении клеток опухоли контрольных (1 группа) и животных, принимавших мальтодекстрин. Так, показатели для СДГ после 24 ч от начала приема препаратов для этих животных составили 4,9±0,45 и 52,2±5,68%. К концу срока наблюдения (30 сут) обнаруживалось снижение активности СДГ и отрицательное значение индекса указывало на наличие цитотоксического эффекта в результате деградации опухолевых клеток.

При гейтировании данных относительно детектора бокового светорассеяния (side scatter, SSC) и прямого (малоуглового) светорассеяния (forward scatter, FSC) установлено, что на 14-й день после начала приема Φ С, количество в полной мере дифференцированных клеток было достоверно ниже у животных, принимавших «ОХҮхлорофилл» (49,36±3,75%). Тогда как у животных 1-й группы процент больших клеток составил 59,37±3,2%, принимавших мальтодекстрин и хлорофилл E6 62,5±2,4% и 52,8±4,6% соответственно. Эти данные указывают на выраженное действие «ОХҮхлорофилла» на процесс дифференцировки опухолевых клеток.

В настоящее время показано, что существуют формы хлорофилла, поглощающие свет с длиной волны 700, 710 и даже 720 нм. Эти формы хлорофилла, поглощающие свет с большой длиной волны, обладают способностью к флуоресценции в инфракрасном диапазо-

не. Для хлорофиллина и хлорина Е6 при длине волны возбуждения 405 нм длина волны эмиссии составляет 720 нм. Это свойство указанных соединений было использовано нами для определения их поглощения опухолевыми клетками с помощью проточной цитофлуориметрии. Установлено, что уже на 5-й день обнаруживалось достоверное увеличение количества клеток с поглощенными хлорофиллином у животных принимавших «ОХҮхлорофилл» по сравнению с животными без и при приеме мальтодекстрина и хлорина Е6. При этом у этих животных практически 100% клеток демонстрировали сильнопозитивный сигнал, а с течением времени количество клеток резко снижалось, что, вероятно, было связано с их деградацией.

Детекция флуоресценции клеток, окрашенных акридиновым оранжевым (AO), с помощью проточного цитофлуориметра с применением двухпараметрического анализа зеленого спектра против оранжевого позволила нам охарактеризовать функциональное состояние клеток после воздействия образцов. Низкий процент клеток, флуоресцирующих только в оранжевом спектральном диапазоне (нежизнеспособные клетки), отмечался у животных без приема препаратов ($38,02\pm2,7\%$) через 14 дней после начала эксперимента. Длина волны по эмиссии составила 780 нм, что отражало их гибель в результате повышенной проницаемости. У животных, принимавших мальтодекстрин, процент клеток в состоянии некроза достоверно был ниже ($38,5\pm2,7\%$, p<0,05), чем у животных, принимавших соединения хлорофилла ($52,6\pm2,7\%$, p<0,05).

Для пациентов с злокачественными новообразованиями различной локализации отсутствие эффективного лечения приводит к низкой выживаемости и метод лечения с применением фотосенсибилизаторов является терапевтическим вариантом для таких больных [2, 3]. На настоящий момент, ФДТ – одно из немногих направлений в медицине в котором российская наука является конкурентоспособной. Развитие метода и поиск новых аспектов его применения является актуальной и важной задачей для российских исследователей. Свойство «ОХУхлорофилла» накапливаться в патологических клетках и тканях определяет его успешное применение для указанного вида терапии. Его биоактивная субстанция, хлорофиллин, способен стимулировать метаболизм клеток, связанный с переносом энергии на кислород. В этом случае, реактивная синглетная форма кислорода инициирует каскад реакций, приводящий к гибели опухолевой клетки. Полученные нами данные на модели опухоли Эрлиха демонстрируют эффективность «ОХҮхлорофилла» при пероральном приеме.

Список литературы

- 1. Плавский В.Ю., Мостовников В.А., Мостовникова Г.Р., Третьякова А.И., Микулич А.В. Спектрально-люминесцентные свойства комплексов Хлорина е6 и малатдегидрогеназы // Журнал прикладной спектроскопии. 2004. Т. 71. № 6. С. 749-758
- 2. Тулаева Л.А., Потапов Г.П. Синтез и свойства водорастворимых производных Хлорина Е6 // Химия растительного сырья. 2002. №2. С. 85-88.
- 3. Plemel J.R., Caprariello A.V., Keough M.B., Henry T.J., Tsutsui S., Chu T.H., Schenk G.J., Klaver R., Yong V.W., Stys P.K. Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis ournal of Cell Biology. 2017. Vol. 216. № 4. P. 1163–1181

УДК 577.22+606

Побойнев В.В.¹, Акуневич А.А.¹, Хрусталёв В.В.¹, Хрусталёва Т.А.², Арутюнян А.М.³, Кордюкова Л.В.³

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск¹;

ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск²;
НИИ Физико-химической биологии МГУ, Москва³
dremozzew@mail.ru, nastya.akunevich@gmail.com, vvkhrustalev@mail.ru,
tanissia.lir@gmail.com, alarut@belozersky.msu.ru,
kord@belozersky.msu.ru

Аминокислотная замена D46G увеличивает бета-структурный потенциал эпидермального фактора роста человека

В статье проведён биоинформатический анализ влияния аминокислотной замены D46G в эпидермальном факторе росте человека на его структуру и связывание с рецептором. Данная замена уменьшает сродство пептида с рецептором, способствуя формированию метастабильного бета-тяжа. По данным КД пептид с заменой D46G образует больше антипараллельной бета-структуры, чем нативный пептид.

Ключевые слова: эпидермальный фактор роста, аминокислотная замена, структурный переход.

Poboinev V.V.¹, Akunevich A.A.¹, Khrustalev V. V.¹, Khrustaleva T.A.², Arutyunyan A.M.³, Kordyukova L.V³.

Belarusian State Medical University¹, Minsk Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus², Minsk

A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology³, Moscow

Amino acid replacement D46G increases the beta-structural potential of epidermal growth factor

In this work a bioinformatic analysis of D46G amino acid substitution in the human epidermal growth factor on its structure and binding to the receptor has been performed. This substitution reduces the affinity of the factor to its receptor, contributing to the formation of a metastable beta strand. As a result, the peptide with D46G substitution forms more antiparallel beta structure than the native one according to the CD data.

Key words: epidermal growth factor, amino acid replacement, structural shift.

Введение. Эпидермальный фактор роста (ЭФР) человека представляет собой пептил, состоящий из 53 аминокислотных остатков [1]. В молекуле ЭФР можно выделить ригидное бета-структурное ядро, формирующее четыре бета-тяжа, и лабильные N- и C-концы [2]. Функция данного пептида заключается в стимулировании клеточного роста и дифференцировки эпителиального покрова, сигнал к которым передаётся после активации рецептора эпидермального фактора роста через его тирозинкиназный внутриклеточный домен [3]. В результате деление клеток в присутствии ЭФР в концентрации в районе 1 нг/мл происходит быстрее, чем деление клеток без эпидермального фактора роста. Важность подробного изучения данного лиганд-рецепторного взаимодействия важна в рамках борьбы со злокачественными опухолевыми процессами различной локализации. Рецептор эпидермального фактора гиперэкспрессирован при различных видах рака [4]. В клинической практике на сегодняшний день применяются только дорогостояшие моноклональные антитела и ингибиторы тирозинкиназы.

Цель данного исследования заключается в разработке антагониста рецептора эпидермального фактора роста на основе его природного лиганда.

Материалы и методы исследования. Информацию о аминокислотном составе и о вторичной структуре ЭФР брали из PDB (https://www.rcsb.org/). Стабильность ЭФР и ЭФР с мутацией D46G определяли с помощью оригинального алгоритма PentaFold 3.0 (https://chemres.

bsmu). Влияние мутации на неструктурированность С-конца определяли с помощью алгоритма DisEMBL (http://dis.embl.de/). Влияние мутации на сродство к рецептору эпидермального фактора роста исследовали с помощью алгоритма mCSM-PPI2 (http://biosig.unimelb. edu.au/mcsm ppi2/). Для определения вторичной и третичной структуры ЭФР и ЭФР с мутацией D46G, а также определения структурных переходов использовали соответствующие синтетические пептиды. Пептиды синтезированы фирмой Elabscience Inc. на автоматическом синтезаторе согласно стандартному Fmoc-протоколу. Контроль качества синтезированных пептидов осуществлялся той же фирмой при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC) и жидкостной хроматографией в сочетании с масс-спектрометрией (LC/MS). Вторичную структуру ЭФР и ЭФР с мутацией D46G определяли с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Для приготовления раствора замачивали 700 мкг пептидов в 1 мл 0.01 М фосфатного буфера при pH=7,4 и температуре в 5 °C. Для формирования дисульфидных связей выдерживали образцы в течении 12 часов. Нерастворённую часть пептидов удаляли центрифугированием при ускорении 16000 g в течение 10 минут. Концентрацию пептидов в надосадочной жидкости определяли с помощью спектрофлуориметра SOLAR CM2203, используя интенсивность поглощения на 280 нм, при которой коэффициент молярной экстинкции каждого пептида равен 5500 M-1 · см-1. Длина оптического пути в кювете – 1 см. Молярная концентрация рассчитывалась путём деления оптической плотности при 280 нм на коэффициент экстинкции умноженный на длину оптического пути. Концентрация ЭФР составила 495,32 мкг/ мл, а концентрация ЭФР с мутацией D46G 358,03 мкг/мл.

Спектр кругового дихроизма раствора пептидов снимали с помощью спектрографа Chirascan в ближнем ультрафиолете: от 240 до 340 нм. При этом использовали кювету с длиной оптического пути 0,02 см. Скорость нагревания раствора составляла 1 градус в минуту. Первый спектр снимали при температуре 5°С, далее — с шагом в 5 градусов — до 80°С. Каждый спектр обрабатывали с помощью программы Pro-Data Viewer путём сглаживания методом Савицкого-Галлея. Деконволюцию средних для всех температур спектров КД проводили с помощью алгоритма BeStSel [5, 6].

Результаты и их обсуждение. На сегодняшний день известно пять 3D структур пептида эпидермального фактора роста: четыре получены при помощи рентгенологического исследования (1JL9, 3NJP, 1IVO, 1NQL) и одна — при помощи ЯМР (2KV4). Вторичная структура ЭФР, полученная при помощи рентгена, включает в себя четыре

бета-тяжа: Val19-Ile23, Lys28-Asn32, Tyr37-Ile38, Tyr44-Arg45, которые присутствуют на четырёх 3D структурах. В молекуле ЭФР присутствует шесть остатков цистеина, между которыми образуются три дисульфидные связи. Таким образом, на наш взгляд аминокислотная последовательность от первого остатка цистеина (Cvs6) и до последнего (Cys42) не должна претерпевать изменения. Последний же бетатяж Туг44-Arg45 является нестабильным (рис. 1A) и его формирование связано с формированием бета-тяжа Tvr37-Ile38. N- и C-концы пептида являются конформационно лабильными, что должно повышать вероятность формирования более конформационно выгодного комплекса ЭФР с его рецептором. По алгоритму DisEMBL N-конец является нестабильным по трём определениям алгоритма, а С-конец только по одному. Наиболее длинный неструктурированный фрагмент предсказывается до аминокислотного остатка Val19, который и является первым аминокислотным остатком первого стабильного бета-тяжа пептида, поддерживающего конформацию второго бета-тяжа Lys28-Asn32. С-конец пептида (Ile38-Arg53) является неустойчивым лишь по одному определению. После аминокислотной замены D46G нестабильный фрагмент С-конца уменьшился на один аминокислотный остаток и начинается теперь с Gly39. Таким образом аминокислотная замена D46G уменьшает конформационную подвижность С-конца пептида. Действительно, по алгоритму PentaFold 3.0 четвёртый бета-тяж стал более стабильным (метастабильным) в сравнении с его состоянием до замены (рис. 1Б).

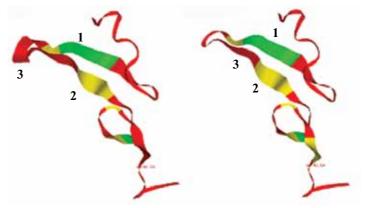


Рис. 1. Стабильность вторичной структуры ЭФР (A) и ЭФР с мутацией D46G (Б). Зеленым (1) обозначены стабильные элементы вторичной структуры, желтым (2) — метастабильные, красным (3) — нестабильные

Для того, чтобы определить влияние аминокислотной замены аспарагиновой кислоты в 46 позиции на аффинность пептида к рецептору, мы заменили данную аминокислоту на другие 19 возможных протеиногенных аминокислот и с помощью алгоритма mCSM-PPI2 определили $\Delta\Delta G$, т.е. разницу ΔG ЭФР и ΔG ЭФР с мутацией [7]. Замена D46G имеет наименьшее значение $\Delta\Delta G$ среди аминокислотных замен с отрицательным значением $\Delta\Delta G$ (табл. 1).

Таким образом, аминокислотная замена D46G снижает лабильность С-конца ЭФР, увеличивая его склонность к формированию бета-тяжа, и снижает сродство ЭФР к рецептору в большей степени, чем другие возможные замены.

После биоинформатической части исследования мы решили проверить влияние мутации D46G на вторичную структуру в эксперименте. На рис. 1А приведен средний спектр КД для ЭФР при температуре от 20 до 50° C, на рис. 1Б- для ЭФР с заменой D46G. Для обоих спектров подобраны весьма схожие из базы данных алгоритма BeStSel. Для ЭФР процент остатков в антипараллельной бета-структуре значительно возрос в результате замены D46G: от 28 до 38%. Этот прирост сопровождается снижением процента остатков в спиралях от 20 до 10%.

Таблица 1. Влияние аминокислотных замен на стабильность комплекса ЭФР с рецептором ЭФР. Приведены все замены, снижающие сродство фактора с рецептором

Аминокислотная замена	ΔΔG, ккал/моль		
D46G	-0,575		
D46A	-0,568		
D46P	-0,460		
D46S	-0,437		
D46T	-0,412		
D46Q	-0,355		
D46K	-0,338		
D46C	-0,181		
D46R	-0,085		

Таким образом аминокислотная замена D46G не только способствует образованию бета-тяжа на месте спирали, что уменьшает лабильность Θ P, но и снижает аффинность фактора к собственному рецептору.

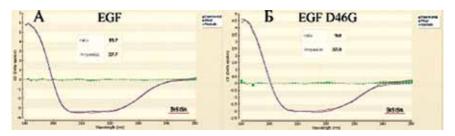


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма (КД) ЭФР (A) и ЭФР с мутацией D46G (Б)

Выводы. Данные биоинформатических расчётов и инструментального исследования показывают возможность использования ЭФР с мутацией D46G в качестве антогониста рецептора эпидермального фактора роста в рамках разработки новых противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ Б20М-025 от 04.05.2020.

Список литературы

- 1. Ogiso H., Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M, Kim J-H., Saito K., Sakamoto A., Inoue M., Shirouzu M., Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains // Cell. 2002. Vol. 110. P. 775-787.
- 2. Lu H. S., Chai J. J., Li M., Huang B. R., He C. H., Bi R. C. Crystal structure of human epidermal growth factor and its dimerization // The Journal of biological chemistry. 2001. Vol. 276. P. 34913–34917.
- 3. Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor // Annual review of biochemistry. 1979. Vol. 48. P. 193–216.
- 4. Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer // Molecular Oncology. 2018. Vol. 12. P. 3-20.
- 5. Micsonai A., Wien F., Kernya L., Lee Y.-H., Goto Y., Réfrégiers M., Kardos J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2015. Vol. 112. E3095-3103.
- 6. Micsonai A., Wien F., Bulyáki É., Kun J., Moussong É., Lee Y.-H., Goto Y., Réfrégiers M., Kardos J. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra // Nucleic Acids Res. 2018. Vol. 46. W315–W322.
- 7. Carlos H. M. Rodrigues, Yoochan Myung, Douglas E. V. Pires, David B. Ascher mCSM-PPI2: predicting the effects of mutations on protein—protein interactions // Nucleic Acids Res. 2019. Vol. 47. W338–W344.

Попова О.В., Пайгачкина А.С.

Марийский государственный университет Йошкар-Ола yasminka1@mail.ru

Влияние бетулина и бетулоновой кислоты на некоторые характеристики мембран эритроцитов

Одними из перспективных лекарственных молекул с высокой эффективностью считаются тритерпеноиды лупанового ряда. Было проведено исследование влияния бетулина и бетулоновой кислоты на сорбционную способность, деформируемость, осмотическую стойкость мембран эритроцитов, а также количество и агрегацию эритроцитов. Наблюдались изменения всех исследуемых показателей под влиянием бетулина. Эффекты бетулоновой кислоты были схожи с бетулином.

Ключевые слова: эритроциты, мембрана, бетулин, бетулоновая кислота.

Popova O.V., Paygachkina A.S. Mari State University, Yoshkar-Ola

The effect of betulin and betulonic acid on some characteristics of erythrocyte membranes

Lupane triterpenoids are considered to be one of the most promising drug molecules with high efficiency. The study of the effect of betulin and betulonic acid on the sorption capacity, deformability, osmotic resistance of erythrocyte membranes, as well as the quantity and aggregation of erythrocytes was carried out. Changes in all studied parameters were observed under the influence of betulin. The effects of betulonic acid were similar to those of betulin.

Key words: erythrocytes, membrane, betulin, betulonic acid.

Препараты природного происхождения представляют значительный интерес для исследований, что обусловлено их большой биологической активностью и доступностью. Повышенное внимание уделяется растительным тритерпеноидам, высокое содержание которых обнаружено в бересте некоторых видов берёз [1,2]. При этом главным

тритерпеноидным компонентом, выделяемым из биоматериала, является бетулин. Внимание привлекают также производные бетулина. Некоторые из них проходят предклиническую апробацию или уже применяются в тех или иных областях медицины. Вероятными клеточными мишенями бетулина и его производных являются мембранные структуры, что обусловлено в первую очередь гидрофобностью данных агентов. Важной является оценка и токсического действия данных веществ, побочных эффектов наряду с «полезной» биологической активностью.

Целью исследования являлось изучение влияния тритерпеноидов лупанового ряда — бетулина и бетулоновой кислоты — на такие функциональные характеристики эритроцитарных мембран, как сорбционная способность, деформируемость и осмотическая стойкость. Также была проведена оценка их влияния на количество и агрегацию красных клеток крови. Исследуемые вещества были предоставлены Уфимским институтом химии. Экспериментальная часть была выполнена на кафедре биохимии, клеточной биологии и микробиологии института естественных наук и фармации Марийского государственного университета.

Исследования проводили с кровью белых беспородных половозрелых крыс-самцов (n=5). Забор крови проводили путем декапитации в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта, кровь не хранили, сразу же откручивали плазму. Осадок эритроцитов отмывали охлажденным физиологическим раствором трижды и затем использовали для исследований. Вещества в различных концентрациях добавляли к взвеси эритроцитов, инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре и проводили оценку их влияния. Сорбционную способность оценивали по способности мембран эритроцитов сорбировать метиленовый синий. Деформируемость определяли по соотношению времени растекания капли раствора альбумина ко времени растекания капли разведенной эритроцитарной массы по бумажному фильтру «красная лента» и рассчитывали индекс деформируемости. Осмотическую стойкость эритроцитов оценивали по уровню их гемолиза в растворах NaCl различной концентрации. Количество эритроцитов подсчитывали в камере Горяева. Агрегацию эритроцитов оценивали визуально под микроскопом в мазках крови, окрашенных по Романовскому. Данные показатели отражают функциональное состояние мембран эритроцитов, в том числе и в модельных экспериментах по исследованию влияния различных веществ.

При инкубации эритроцитов с исследуемыми веществами в 10 и 50 мкМ концентрациях статистически значимых различий в сорбционной способности этих клеток по сравнению с контролем обнаружено не было (табл. 1).

Таблица 1. Сорбционная способность эритроцитов крови крыс под влиянием тритерпеноидов

Вещества	Сорбционная способность, % Среднее ± ст.ошибка			
	10 мкМ	50 мкМ	100 мкМ	
Бетулин	43,86±4,63	50,7±3,73	57,34±2,54*	
Бетулоновая кислота	48,93±1,26	46,12±4,77	53,50±3,27*	
Контроль	65,83±0,93			

^{*} Статистически достоверные различия сорбционной способности мембраны эритроцитов крови крыс в контроле и под влиянием исследуемых веществ (p<0,05)

При повышении концентрации до 100 мкМ были выявлены статистически значимые различия по сравнению с контролем. Так, бетулин снижал сорбционную способность эритроцитов на 9% от контроля, а бетулоновая кислота — на 13%. Возможной причиной снижения сорбционной способности эритроцитарных мембран может быть усиление перекисного окисления мембранных липидов и изменение соотношения мембранных белков, таких как β-спектрин, анкирин, α-спектрин, актин и других, а также изменение белок-липидных взаимодействий.

Деформируемость эритроцитов — это еще одно важное их свойство, обеспечивающее способность этих клеток выполнять физиологические функции. Она обусловлена множеством факторов, главными из которых являются вязкостные и эластические свойства мембраны, содержание в этих клетках гемоглобина, а также изменение концентрации внутриклеточных ионов кальция [3].

Из данных табл. 2 видно, что при концентрации исследуемых веществ 10 мкМ статистически значимых различий по сравнению с контролем выявлено не было.

Таблица 2. Влияние исследуемых веществ на деформируемость эритроцитов

Вещества	Индекс деформируемости, Среднее ± ст.ошибка			
Бещества	10 мкМ	50 мкМ	100 мкМ	
Бетулин	1,15±0,045	1,09±0,03*	0,88±0,07*	
Бетулоновая кислота	1,45±0,25	1,95±0,04	0,89±0,06*	
Контроль	1,91±0,06			

 $^{^*}$ Статистически достоверные различия индекса деформируемости мембраны эритроцитов крови крыс в контроле и под влиянием исследуемых веществ (p<0,05)

В присутствии 50 мкМ бетулина индекс деформируемости эритроцитов оказался почти в 2 раза ниже контроля (p=0,043). Бетулоновая кислота в такой же концентрации не оказывала эффекта. И только при повышении концентрации исследуемых веществ до 100 мкМ наблюдается снижение индекса деформируемости по сравнению с контролем более чем в 2 раза, как под действием бетулина, так и бетулоновой кислоты. Снижение индекса деформируемости свидетельствует о том, что мембрана эритроцита становится жестче, что может сказаться и на кислород-транспортирующей функции. Вероятно, эффект исследуемых тритерпеноидов связан с их влиянием на белковую организацию мембраны и на белок-липидные взаимодействия. В частности, заслуживают внимания вероятные изменения в спектриновом цитоскелете эритроцитов, а именно возможные переходы тетрамеров спектрина в димеры, способствующие снижению деформируемости [4].

Способность эритроцита противостоять до определенного предела осмотическому, механическому и другим воздействиям можно определить как его стойкость или резистенстность. Снижение стойкости сопровождается, как известно, усилением гемолиза, когда наблюдается разрушение эритроцита и выход наружу гемоглобина. При этом главная заслуга в поддержании осмотической стойкости эритроцитов принадлежит интегральным белкам мембраны, таким как белок полосы 3 и его конформационным переходам [5,6].

Исследуемые вещества в концентрациях 10 и 50 мкМ показывают тенденцию к снижению гемолиза эритроцитов в растворах 0,3 и 0,2% NaCl (рис. 1, A и Б), что отражает повышение осмотической стойкости эритроцитов в гипотонических растворах. В 100 мкМ концентрации же они не оказывают подобного влияния.

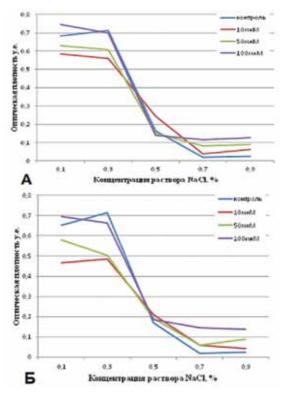


Рис. 1. Изменение оптической плотности растворов NaCl разной концентрации, содержащих эритроциты крови крыс после инкубации с исследуемыми веществами: А) с бетулином; Б) с бетулоновой кислотой

Также была проведена оценка влияния бетулина и бетулоновой кислоты на количество эритроцитов крови крыс. Как было выявлено в предварительных экспериментах, данные вещества не оказывали какого-либо существенного влияния на количество и агрегацию эритроцитов в концентрациях менее 200 мкМ (данные не приведены).

В концентрации 200 мкМ оба исследуемых вещества снижают количество эритроцитов по сравнению с контролем (рис. 2). Под влиянием 200 мкМ бетулина количество эритроцитов снизилось на 22% по сравнению с контролем. В то время как бетулоновая кислота уменьшает количество клеток на 16% по сравнению с контролем. Выявленные различия являются статистически значимыми.

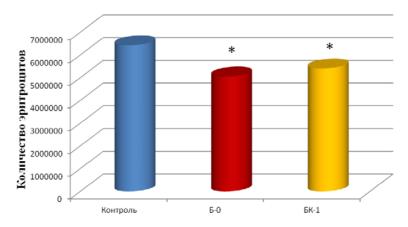


Рис. 2. Влияние бетулина (Б-0) и бетулоновой кислоты (БК-1) на количество эритроцитов

* Статистически достоверные различия количества эритроцитов крови крыс в контроле и под влиянием исследуемых веществ (p<0.05)

При рассмотрении мазков, окрашенных по Романовскому, было обнаружено, что в концентрации 200 мкМ исследуемые вещества вызывают выраженное слипание эритроцитов (рис. 3).

Как видно из полученных данных, эффекты бетулина и бетулоновой кислоты являются концентрационно зависимыми и выражаются в появлении токсического действия на эритроцитарную мембрану при повышении концентрации до 100 и 200 мкМ, которое отсутствует при более низких концентрациях.

Полученные данные представляют интерес для дальнейший исследований и выяснения механизма действия данных веществ на мембраны.

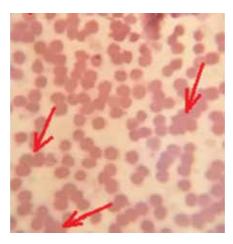


Рис. 3. Агрегация эритроцитов под действием 200 мкМ бетулоновой кислоты (аналогичная картина наблюдалась и под действием 200 мкМ бетулина). Стрелками указаны агрегаты

Список литературы

- 1. Calderon C. et al. Lipid Atlas of Keratinocytes and Betulin Effects on its Lipidome Profiled by Comprehensive UHPLC–MS/MS with Data Independent Acquisition Using Targeted Data Processing / C. Calderon, L. Rubarth, M. Cebo, I. Merfort, M. Lammerhofer // Proteomics. N 20. 2019. P. 11-21
- 2. Галайко Н.В. Цитотоксическая активность гетероциклических производных // Вестник пермского научного центра. 2015. № 2. С. 20–22
- 3. Левин Г.Я., Сухарева Е.Г. Связь деформируемости эритроцитов с гликированием гемоглобина и образованием микровезикул // Сибирский научный медицинский журнал. -2015. Т. 35. № 2. С. 37-41
- 4. Yamaguchi T. et al. Membrane perturbations of erythrocyte ghosts by spectrin release/ T. Yamaguchi, S. Ozaki, T. Shimomura, S. Terada // The journal of biochemistry. -2007. $-N_2$ 141(5). -P. 747-754
- 5. Аль-Рабии М.А.М. и др. Осмотическая резистентность эритроцитов крыс и концентрация тиоловых групп белков их мембраны зависят от длительности умеренной гипотермии/ М.А.М. Аль-Рабии, Ш.И. Чалабов, М.Д. Астаева, Н.К. Кличханов// Современные проблемы науки и образования.— 2015. № 3. C. 5-9.

6. Basu A., Chakrabarti A. Defects in erythrocyte membrane skeletal architecture // Biochemical roles of eukaryotic cell surface macromolecules. -2014. - No 842. - P. 41-59.

УДК 575.1: 575.113.2

Постникова Л.А., Нониашвили Е.М., Паткин Е.Л. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург ofeliyafutman@gmail.com

Действие лактоферрина на развитие ранних зародышей мышей, при внутриутробном воздействии бисфенола А

Проведен сравнительный анализ веса 15-дневных зародышей мышей, матерям которых в первый день беременности однократно инъецировали: 0,8 мг/0,1 мл бисфенола A ($F\Phi A$); 0,1 мг/0,1 мл апо-лактоферрина человека либо 0,1 мг/0,1 мл апо-лактоферрина с последующим введением 0,8 мг/0,1 мл $F\Phi A$. Обсуждается возможное протективное влияние аполактоферрина на токсическое воздействие $F\Phi A$ на зародыши.

Ключевые слова: 15-дневные зародыши мыши; бисфенол A; рекомбинантный апо-лактоферрин человека.

Postnikova L.A., Noniashvili E.M., Patkin E.L.Institute of Experimental Medicine of the Russian Academy of Sciences St. Petersburg

The effect of lactoferrin on the development of early embryos in mice with intrauterine exposure to bisphenol A

A comparative analysis of the weight of 15-day-old embryos of mice, whose mothers were injected on the first day of pregnancy: $0.8 \, \text{mg} / 0.1 \, \text{ml}$ of bisphenol A (BPA); $0.1 \, \text{mg} / 0.1 \, \text{ml}$ apo-lactoferrin or $0.1 \, \text{mg} / 0.1 \, \text{ml}$ apo-lactoferrin followed by $0.8 \, \text{mg} / 0.1 \, \text{ml}$ BPA. Potential protective effect of apolactoferrin on the toxic effect of BPA on embryos is discussed.

Key words: 15-day old mouse embryos; bisphenol A; recombinant human APO-lactoferrin.

Введение. Бисфенол $A(\Phi A)$ — синтетический экотоксикант, применяемый в качестве отвердителя при изготовлении пластмасс, входит в состав некоторых пищевых упаковочных материалов, композитных материалов, используемых в стоматологии и др. ΦA способен

негативно влиять на репродуктивную систему млекопитающих даже в низких дозах и оказывать влияние на эмбриональное развитие [1]. Особенно критично для организма воздействие БФА в период пренатального развития, поскольку механизмы детоксикации у развивающегося плода не сформированы. Это обусловлено рядом причин. Так, было показано, что микромолярные дозы БФА повышают уровень окислительного стресса через 1—4 часа после воздействия [2]. Показано, что наномолярные и микромолярные дозы БФА накапливаются в митохондриях клеток и вызывают митохондриальную дисфункцию [3]. Было продемонстрировано угнетающее воздействие БФА на активность антиоксидантных ферментов и неферментативных антиоксидантов в головном мозге и мозжечке [4]. Также была обнаружена цитотоксичность, вызванная повреждением ДНК активными формами кислорода [5].

Лактоферрин (ЛФ) является мультифункциональным белком семейства трансферринов и существует в двух формах: железонасыщенной (холо-ЛФ) и и железоненасыщенной (апо-ЛФ), которая считается активной. ЛФ присутствует во всех секретах экзокринных желез, во вторичных гранулах нейтрофилов, в наибольшем количестве ЛФ обнаруживается в молозиве [6]. В литературе представлены многочисленные данные, доказывающие его антибактериальные, противовирусные, противовоспалительные функции. Особый интерес представляет изучение антиоксидантных и детоксицирующих свойств лактоферрина [7].

Ранее нами было показано, что введение малых доз БФА мышам в первый день беременности ускоряет развитие зародышей до стадии бластоцисты и при этом снижает количество бластомеров в зародышах [8]. В настоящей работе исследовали способность ЛФ нивелировать негативное влияние окислительного стресса, вызванного воздействием БФА на ранние зародыши. Так как вес характеризует общее состояние организма и является информативным количественным показателем на ранней стадии развития зародышей [9], было проведено сравнение показателей веса постимплантационных зародышей на 15 день эмбрионального развития.

Материалы и методы исследования. Эмбрионы 15-го дня развития получали от половозрелых самок мышей гибридов F1 (C57BLX CBA) из питомника «Рапполово» после гормональной стимуляции и спаривания их с самцами [8]. Всех самок в первый день беременности делили на четыре группы: первая группа — интактный контроль, во второй группе («Б Φ A») беременным самкам внутрибрюшинно одно-

кратно вводили 0.8 мг/0.1 мл бисфенола A («Sigma-Aldrich») в растворе кунжутного масла. Третьей группе («ЛФ») животных — однократно вводили 1 мг /0.1 мл лиофилизированного рекомбинатного апо-лактоферрина человека (БГУ, г.Минск) в растворе фосфатного буфера. Четвертой группе («ЛФ+БФА») сначала вводили 1 мг/0,1 мл ЛФ, а через три часа 0.8 мг/0.1 мл бисфенола А. На 15 день беременности животных забивали дислокацией шейных позвонков. Эмбрионы извлекали из матки, высвобождали из амниотических оболочек и индивидуально взвешивали на аналитических весах («ОНАUS»). В каждой группе определяли средний вес зародышей. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Краскела-Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при р <0.05.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлены средние значения весовых показателей 15-дневных эмбрионов в контрольной и экспериментальных группах. В работе исследовано 116 зародышей. Наименьший средний вес зародышей наблюдался в группе «БФА» — 82 мг, который значительно отличался от контроля — 134 мг. Средний вес зародышей в группе «ЛФ» — 149 мг незначительно превышал показатели в контрольной группе — 134 мг. Наибольший средний вес зародышей был представлен в группе «ЛФ+БФА» — 175 мг, что на 41 мг превышает средний вес зародышей в контрольной группе. Показатели среднего веса 15-дневных эмбрионов во всех четырех группах имеют статистически значимые отличия (p < 0,0001).

Таблица 1. Вес 15-дневных эмбрионов мышей в контрольной и экспериментальных группах

Группа	Контроль	БФА	ЛФ	ЛФ+БФА
Bec, мг (M±m)	134±4,0	82±2,6	149±4,6	175±4,6

Примечание: M — средний вес, m — стандартная ошибка среднего; p < 0.0001.

Замедление роста 15-дневных зародышей мышей, наблюдаемых в группе «БФА» можно объяснить токсическим эффектом БФА, обусловленным его участием в процессах окислительного стресса, через

механизмы, связанные с активными формами кислорода [4]. Эти данные согласуются с отмеченными выше нашими данными о влиянии БФА на развитие бластоцист под влиянием БФА [8]. Также известны данные о критическом влиянии БФА на рождение детей с низким весом [10]. На сегодняшний день не определены точные молекулярные механизмы действия БФА. Известно, что большая часть БФА превращается в менее токсичные бисфенол G и бисфенол S, оставшиеся свободные молекулы БФА индуцируют активные формы кислорода посредством ферментативного и неферментативного образования феноксильных радикалов. Последующие реакции этих радикалов с НАДФН или внутриклеточным глутатионом способствуют образованию множества свободных радикалов, в том числе супероксидов, пероксидов и гидроксильных радикалов [2]. Суммируя вышесказанное, можно предполагать, что БФА может проявлять свою токсичность за счет увеличения количества свободных радикалов, и как следствие, способствуя окислительному стрессу.

С другой стороны, было установлено, что при воздействии іп vivo ЛФ приводит к значительному повышению гистоморфометрических показателей костеобразования [11]. Кроме того, ЛФ является природным хелатором железа и реализует свои антиоксидантные свойства находясь в апо-форме. Железо – важный компонент цитохромов и кислородсвязывающих молекул. ЛФ способен ингибировать перекисное окисление липидов путем блокирования образования свободных гидрооксильных радикалов [12]. При исследовании антиоксидантных свойств экзогенного ЛФ, было продемонстрировано, что они реализуются за счет активации ферментов антиоксидантной системы. Было показано, что при использовании экзогенного ЛФ экспрессия мРНК антиоксидантных ферментов и общий антиоксидантный статус увеличивались, а перекисное окисление липидов снижалось [13]. В целом, вне зависимости от происхождения (экзогенный/эндогенный) лактоферрин способен снижать интенсивность перекисного окисления липидов [14]. Такое действие может приводить к описанному увеличению веса под воздействием ЛФ в том числе и за счет способности ЛФ участвовать в регуляции роста костной ткани и тем самым частично ингибировать действие БФА в группе «ЛФ+БФА». Основываясь на результатах анализа, можно предположить возможную протективную роль лактоферрина в отношении последствий токсического воздействия БФА на ранние зародыши мышей.

Благодарность. Работа поддержана грантом РФФИ 18-015-00122 А.

Список литературы

- 1. Golub M.S., Wu K.L., Kaufman FL. et al. Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure // Birth Defects Res. (Part B). 2010. Vol. 89. P. 441-466.
- 2. Babu S., Uppu S., Claville M.O., Uppu R.M. Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity // Toxicology mechanisms and methods. 2013. Vol. 23. P. 273–280.
- 3. Pfeifer D., Chung Y.M., Hu M.C. Effects of Low-Dose Bisphenol A on DNA Damage and Proliferation of Breast Cells: The Role of c-Myc // Environ Health Perspect. 2015. Vol. 123(12). P. 1271-1279.
- 4. Ahmed R.G., Walaa G.H., Asmaa F.S. Suppressive effects of neonatal bisphenol A on the neuroendocrine system // Toxicol Ind Health. 2018. Vol. 34(6). P. 397-407.
- 5. Leem Y.H., Oh S., Kang H.J., Kim J.H., Yoon J., Chang J.S. BPA-toxicity via superoxide anion overload and a deficit in beta-catenin signaling in human bone mesenchymal stem cells // Environ Toxicol. 2016. Vol. 32(1). P. 344-352.
- 6. Legrand D., Pierce A., Elass E., Carpentier M., Mariller C. and J. Mazurier. Lactoferrin structure and functions // Adv Exp Med Biol. 2008. Vol. 606. P. 163-194.
- 7. Hao L., Shan Q., Wei J., Ma F., Sun P. Lactoferrin: major physiological functions and applications // Current Protein & Peptide Science. 2018. Vol. 20(2). P. 139-144.
- 8. Нониашвили Е.М., Грудинина Н.А., Кустова М.Е., и др. Метилирование ДНК в раннем эмбриогенезе мышей под влиянием бисфенола А // Экологическая генетика. 2017. Т. 15. № 3. С. 42–53.
- 9. Ingram D.K., Reynolds M.A. The relationship of body weight to longevity within laboratory rodent species. In: Woodhead, A.D., Thompson, K.H. (Eds.), Evolution of Longevity in Animals // Plenum Press. 1987. P. 247–282
- 10. Welshons W. V., Nagel S. C., & vom Saal, F. S. Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure // Endocrinology. 2006. Vol.147(6). P.56–69.
- 11. Naot D, Grey A, Reid I.R, Cornish J. Lactoferrin-a novel bone growth factor // Clin Med Res. 2005. Vol. 3(2). P. 93-101.
- 12. Lindmark-Mansson H., Akesson B. Antioxidative factors in milk // Br. J. Nutr. 2000. Vol. 84 (Suppl. 1). P. 103–110.

- 13. Wang, Y. Z., Xu, C. L., An, Z. H., Liu, J. X., & Feng, J. Effect of dietary bovine lactoferrin on performance and antioxidant status of piglets // Animal Feed Science and Technology. 2008. Vol. 140. P. 326-336.
- 14. Sandomirsky B.P., Galchemko S.E., Galchenko K.S. Antioxidative properties of lactoferrin from bovine colostrums before and after its lyophilization // Cryoletters. 2003. Vol. 24. P. 275–280.

УДК 612.398.145.2+ 621.384.82

Рута-Жуковская Е.Я., Сяхович В.Э., Бабарико Д.В., Бакакина Ю.С., Беляев С.А., Прадун С.А.

УЗ Национальная антидопинговая лаборатория, аг. Лесной, 31, Беларусь e.ruta@antidoping.by

Определение в крови человека кровезаменителей на основе интактных и модифицированных гемоглобинов различного происхождения с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии

В представленной работе был изучен характер химической модификации гемоглобина человека глутаровым альдегидом, сайты модификации α- и β- субъединиц. Разработаны подходы к инструментальному анализу образцов модифицированного гемоглобина человека, а также гемоглобинов различного происхождения в рамках методики определения характеристических фрагментов химически модифицированных гемоглобинов различного происхождения в крови человека с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Ключевые слова: гемоглобины млекопитающих, тандемная хроматомасс-спектрометрия, кровезаменители на основе гемоглобина, глутаровый альдегид.

Ruta-Zhukouskaia E. Ya., Syakhovich V.E., Babaryko D.V., Bakakina Y.S., Beliaev S.A., Pradun S.A. National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus

Identification of blood substitutes in human blood based on intact and modified hemoglobins of different origins using liquid chromatography-mass spectrometry

In the presented work, the nature of the chemical modification of human hemoglobin by glutaraldehyde, sites of modification of the α - and β -subunits were studied. Approaches to instrumental analysis of samples of modified human

hemoglobin, as well as hemoglobins of various origins, have been developed within the framework of the method for determining characteristic fragments of chemically modified hemoglobins of various origins in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry.

Key words: mammalian hemoglobins, tandem chromatography-mass spectrometry, hemoglobin-based blood substitutes, glutaraldehyde.

В настоящее время постоянно возрастает потребность в трансфузии цельной крови и ее отдельных компонентов как в связи с ростом числа операций по пересадке и транспортировке органов и тканей, так и с увеличением частоты возникновения экстренных ситуаций, обусловленных природными факторами.

Разработка искусственных заменителей крови с газотранспортной функцией базируется на целом ряде принципиальных преимуществ перед донорской кровью, таких как: универсальность, отсутствие необходимости в изосерологическом подборе, инфекционная безопасность, отсутствие риска иммунологического конфликта, длительные сроки годности, способность длительное время циркулировать в кровеносном русле реципиента с сохранением газотранспортной функции, возможность в случае необходимости увеличения их промышленного производства и накопления в больших количествах [1, 2].

В настоящее время одним из основных проблемных направлений допинг-контроля является выявление употребления спортсменами усилителей переноса кислорода различной природы. Это касается не только таких манипуляций как аутогемотрансфузии, но и использование новых разработок в области стимуляторов гемопоэза, а также различных типов альтернативных кровезаменителей.

Широко известным направлением разработок в области кровезаменителей является использование в качестве основы природных переносчиков кислорода, в частности гемоглобинов различного происхождения. Первые разработки в этой области оказались не очень удачными, и единственным зарегистрированным препаратом этой группы является Hemopure (HBOC-201). На данный момент появился ряд новых кровезаменителей (OxyVita, MP4CO, Hemoxycarrier, PNPH) для которых было заявлено производителями отсутствие многих выявленных у предыдущих поколений побочных эффектов [3]-[5].

Хромато-масс-спектрометрия (ХМС) является одним из самых распространенных методов в исследованиях белков и пептидов. Тандемная ХМС применяется для анализа смесей белков, по сложности превышающих аналитические возможности метода «картирования масс пептидов» (РМF).

В настоящей работе описывается разработка и валидация методики определения кровезаменителей на основе интактных и модифицированных гемоглобинов различного происхождения с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Материалы и методы исследования. Химическую модификацию гемоглобина человека (hHb) осуществляли с использованием глутарового альдегида (ГА) (Sigma, США) в молярном соотношения 8/1 (ГА / hHb). Полученный модифицированный гемоглобин был подвергнут фракционированию с использованием ячеек для ультрафильтрации с различными пределами отсечения масс белков.

В качестве положительных контрольных образцов использовали сыворотку крови (отрицательный контрольный образец) с внесенными препаратами бычьего (bHb), свиного (рНb), лошадиного (eHb) гемоглобинов (Sigma, США), а также модифицированного глутаровым альдегидом гемоглобина человека (hHbmod). Очистку описанных выше проб, проводили с использованием мультиаффинных картриджей (MARS, Agilent, США). Ферментативный гидролиз осуществляли, применяя эндопротеазы трипсин и химотрипсин (Sigma, США). Анализ гидролизатов гемоглобинов проводили методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения на сверхвысокоэффективном жидкостном хроматографе Dionex Ultimate 3000, масс-спектрометре высокого разрешения О Exactive Plus (Thermo Scientific, США) и квадруполь-времяпролетном массспектрометре Agilent 6550 Q-TOF (США) с использованием обращенно-фазной колонки BioBasic C8 2,1×150 мм (5 мкм) (Thermo, США).

Результаты и их обсуждение.

Уникальные пептиды гемоглобинов различного происхождения. С использованием программного обеспечения Protein Calculator (Thermo) было проведено моделирование пептидов исследуемых белков (bHb, pHb, eHb), образующихся в результате гидролиза, и выбраны пептиды с уникальной последовательностью для каждого исследуемого белка. После проведения ферментативного гидролиза и подтверждения возможности детектирование данных пептидов с высокой чувствительностью, был сформирован список специфических пептидов, содержащий наиболее интенсивные дочерние ионы, образующиеся в результате МС/МС-распада (табл. 1).

Таблица 1. Значения m/z уникальных дочерних ионов пептидов гемоглобинов различного происхождения

	Пептид	Материн- ский ион	Дочерний пептид	Дочерние ионы
	VDEVCCEAL CD	551,2804	GGEALGR	659,3471
bHb	VDEVGGEALGR		VGGEALGR	758,4155
DHD	EEEDWI OADEON	711 9779	LQADFQK	849,4465
	EFTPVLQADFQK	711,8668	PVLQADFQK	1045,5677
	VGGQAGAH- GAEALER	711.8578	GAEALER	745,3839
pHb			HGAEALER	882,4428
рпо	LLGNVIVVVLAR	633,4188	IVVVLAR	769,5294
	LLGIVIVVVLAR	033,4188	GNVIVVVLAR	1039,6622
	VGDALTLAVGHLD-	729 1412	DLHAHK	720,3787
еНb	DLPGALSNLSDLHAHK	738,1412	SNLSDLHAHK	1121,5698
	FLSSVSTVLTSK	(24.050	STVLTSK	735,4246
		634,858	SNLSDLHAHK	921,5251

Модифицированные пептиды гемоглобина человека

В результате проведения масс-спектрометрического анализа был выявлен ряд модифицированных пептидных последовательностей гемоглобина человека, содержащих глутаровый альдегид. Наиболее интенсивные дочерние ионы, содержащие целевую модификацию, образующиеся в результате МСМС-распада представлены в табл. 2.

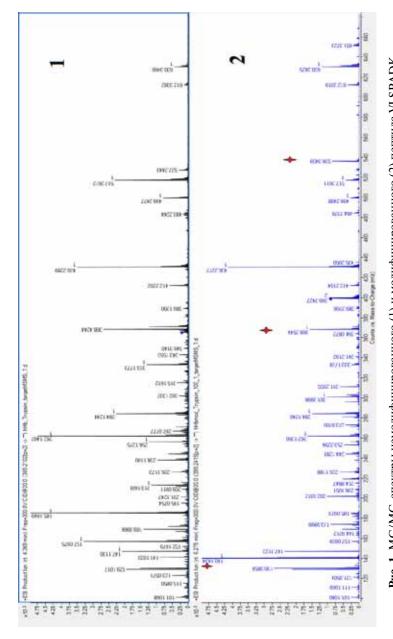
На следующем этапе исследований был изучен характер массспектрометрического распада модифицированных пептидов гемоглобина человека, подтверждены предполагаемые сайты присоединения глутарового альдегида и выявлены особенности образования дочерних ионов при проведении тандемного масс-спектрометрического анализа на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Agilent 6550 Q-TOF.

Таблица 2. Значения m/z уникальных дочерних ионов модифицированных пептидов гемоглобина человека

Пептид	Материнский ион	Дочерний пептид	Дочерние ионы
		VLSPA	536,3443
VLSPADK	399,2420	VLS	368,2544
		V*	140,1434
	510 7900	VHLT	519,3289
VHLTPEEK	510,7890	VHL	418,2813
		V*	140,1434
GKVGAHAGEY	528,7773	GKVGAH	618,3722
OKVOAHAGEI	328,7773	GKVGA	481,3133
KL	328,2595	K	197,1640
VHL	426 2019	VH	305,1972
VIIL	436,2918 V*		140,1434
GKVNVDEVGGEAL	677 9642	GKVNVDEV	909,5040
GKVNVDEVGGEAL	677,8642	GKVNVDE	810,4355

Как видно из представленного ниже рисунка 1, при тандемного масс-спектрометрическом исследовании нативного и модифицированного пептида, наблюдается образование схожих дочерних ионов Y[M+H]+, и специфических ионов W[M+H]+, что позволяет нам заявить, что в данном пептиде модификация проходит не по лизину, а по N-концевому валину. Кроме того, в масс-спектре модифицированного пептида наблюдается интенсивных пик иона с W[M,H] представленный осколок соответствует дочернему иону модифицированного валина, при этом модификации подвергается W[M,H] аминокислоты. Структурная формула выявленного соединения представлена на рис. 2. Аналогичная закономерность выявлена при анализе W[M,H] выявления при ана

Разработка и валидация методики определения. На основе полученных данных разработана и валидирована методика определения характеристических фрагментов химически модифицированных ге-



α-субъединицы человеческого гемоглобина (экстракция по ионам m/z 365,2107 (заряд +2) и m/z 399,2420 (заряд Рис. 1. МС/МС-спектры немодифицированного (1) и модифицированного (2) пептида VLSPADK +2), cootbetctbehho)

$$H_{2}C$$
 H_{2}
 H_{3}
 H_{4}
 H_{4}
 H_{5}
 $H_{$

Рис. 2. Структурная формула модифицированного глутаровым альдегидом осколка валина ($C_0H_{17}N$, m/z 140,1434)

моглобинов различного происхождения в крови человека с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Для валидации методики проводили ее оценку по следующим параметрам: специфичность, чувствительность (предел обнаружения), робастность.

Поскольку образцы гидролизатов модифицированных гемоглобинов содержат значительное количество немодифицированных пептидов гемоглобина данного организма, соответственно детекцию данных модифицированных белков достаточно осуществлять по специфическим пептидам этих гемоглобинов. С целью повышения чувствительности разрабатываемой методики принято решение о выявлении модифицированных фрагментов только среди пептидов гемоглобина человека, поскольку наличие любых пептидов свиного, бычьего и лошадиного гемоглобинов позволяет судить о манипуляциях, направленных на использование переносчиков кислорода на основе гемоглобина.

Специфичность данной методики подтверждали сравнением масс-спектров гидрализатов отрицательных и положительных контрольных образцов. На рис. 3 представлены сравнительные хроматограммы и масс-спектры целевого пептида β -субъединицы свиного гемоглобина и его дочерних ионов, при этом концентрации определяемых пептидов, соответствуют пределу обнаружения, выявленному при разработке методики.

Чувствительность методики подтверждена на уровне 0,005 мкг/мл для гемоглобинов чужеродного происхождения и 0,050 мкг/мл для модифицированного гемоглобина человека. Для подтверждения робастности методики пробы готовились и анализировались тремя специалистами в разное время.

Таким образом, разработанная методика позволяет с высокой чувствительностью определять в сыворотке крови человека наличие кровезаменителей, на основе модифицированных глутаровым альдегидом гемоглобинов различного происхождения для проведения лабораторного этапа допинг-контроля.

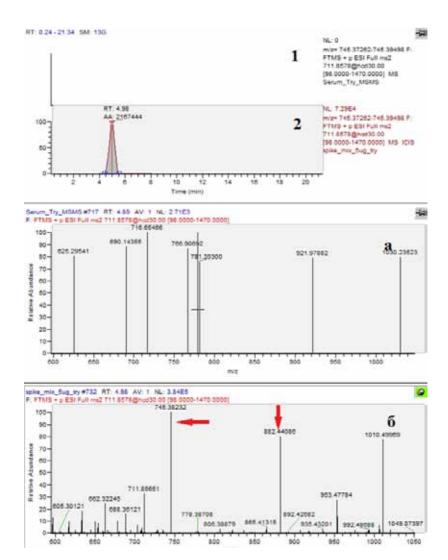


Рис. 3. Хроматограмма (1, 2) и масс-спектры (а, б) пептида VGGQAGAHGAEALER β-субъединицы свиного гемоглобина (экстракция по иону m/z 711,8578 (заряд +2)) в отрицательном (1, а) и положительном контрольного образце (2, б). На масс-спектрах отрицательного (а) и положительного контрольного образца (б) стрелками указаны целевые дочерние ионы m/z 745,3839, m/z 882,4428 (заряды +1)

Список литературы

- 1. Иваницкий Г.Р. Донорская кровь и ее альтернативы //Перфторорганические соединения в биологии и медицине. Пущино, 1999. С. 5-20.
- 2. Усенко Л.В., Шифрин Г.А. Интенсивная терапия при кровопотере. -2-е изд., исправ. и доп. К.: Здоров'я, 1995. 235 с.
- 3. M. Njoku et al., Haemoglobin-based oxygen carriers: Indications and future applications// British journal of hospital medicine 2015. 76(2):78-83.
- 4. J.A. Posluszny et al., Hemoglobin-Based Oxygen Carrier for Traumatic Hemorrhagic Shock Treatment in a Jehovah's Witness// Arch Trauma Res, 2016
- 5. R. Abutarboush et al., Effects of the Oxygen-Carrying Solution OxyVita C on the Cerebral Microcirculation and Systemic Blood Pressures in Healthy Rats.// Journal of Functional Biomaterials, 2014 5(4):246-258
- 6. Nilsson C.L New separation tools for comprehensive studies of protein expression by mass spectrometry// Mass Spectrom. Rev. 2000. V. 19, N 6. P. 390–397

УДК 612.359; 615.281.8

Сальникова О.П.¹, Фатьянова А.В.¹, Яровая О.И.^{1,2}, Салахутдинов Н.Ф.^{1,2} Новосибирский государственный университет¹, ФГБУН² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН Новосибирск^{1,2} Сальникова О.П.- lelka515@yandex.ru Фатьянова А.В.- allium@list.ru Яровая О.И.- ооо@nioch.nsc.ru Салахутдинов Н.Ф. — anvar@nioch.nsc.ru

Влияние нового противовирусного агента камфецина на морфофункциональные корреляты углеводного обмена

Изучены изменение концентрации глюкозы крови крыс и морфологическая реакция печени крыс на введение камфецина (1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-илиден-аминоэтанол). Гипергликемический

эффект камфецина при использовании дозировок 25, 50 (в течение 5 суток) и 100 мг/кг (в течение 7 суток) исчезает при введении в течение 14 суток. Структурные корреляты углеводного обмена изменяются незначительно.

Ключевые слова: камфецин, римантадин, печень, глюкоза, структурная реакция гепатоцита.

Salnikova O.P.¹, Fatianova A.V.¹, Yarovaya O.I.^{1,2}, Salakhutdinov N.F.^{1,2} Novosibirsk State University¹, N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences² Novosibirsk^{1,2}

Effect of new antiviral agent camphecin on morpho-functional correlates of carbohydrate metabolism

We studied the effect of camphecin (1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1] heptan-2-ylidene-aminoethanol) on rat blood plasma glucose concentration and morphological correlates in rat liver. Hyperglycemic effect of camphecin in doses 25, 50 (over 5 days) and 100 mg/kg (over 7 days) disappeared under 14 days administration. Structural correlates had no significant alterations.

Key words: camphecin, rimantadin, liver, glucose, hepatocyte structural correlate.

Введение. Серотип вируса гриппа человека А мутирует быстрее и чаще остальных типов, и быстро вырабатывает резистентность к лекарственным средствам [1]. Новый противовирусный агент камфецин (1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанол) является перспективной заменой устаревшим препаратам. Агент показал высокую противовирусную активность ингибирования репродукции вирусов гриппа A H1N1, H3N2, H5N2 и гриппа В на ранних этапах развития вирусных частиц, проявляя низкую токсичность [2, 3]. Камфецин является производным камфоры, метаболизирующимся в печени [4]. Камфора и ее соединения обладают перечнем разнообразных эффектов, включающие как обезболивающее, так и противомикробное действие [5]. Она стимулирует гликолиз и аэробное окисление, повышает сопряженность окисления и фосфорилирования, а также улучшает синтез АТФ, креатининфосфата и гликогена в сердечной мышце [6,7]. Известно, что глюкоза является основным источником энергии в организме млекопитающих, в связи с этим поддержание

гомеостаза глюкозы в организме — очень важный и тонко регулируемый процесс [8]. Его поддержание во многом зависит от активности печени, в которой происходят гликогенсинтез, гликогенолиз, глюконеогенез [9,10]. Целью данного исследования явилось изучение морфофункциональных коррелятов углеводного обмена крыс: концентрации глюкозы крови, локализации отложений гликогена в печени как в условиях введения нового противовирусного агента камфецина в разных дозировках (25, 50 мг/кг), так и при длительном введении (7 и 14 суток).

Ход эксперимента. Работа проведена на самках крыс линии WAG с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к питьевой воде и корму. Четыре группы крыс получали лекарственные агенты внутрижелудочно один раз в сутки в течение 5 суток: контроль (введение физиологического раствора), камфецин (25 мг/кг), камфецин (50 мг/кг), римантадин (100 мг/кг). Шести группам экспериментальных животных внутрижелудочно один раз в сутки вводили в течение 7 и 14 суток: физиологический раствор (две группы разных сроков введения), камфецин (100мг/кг), римантадин (100 мг/кг). Проведено определение концентрации глюкозы в плазме крови с при помощи глюкозооксидазного метода (GOD-PAR) с использованием Набора реагентов «Глюкоза-Ново (500) B-8056 Вектор БЕСТ» по прилагаемым протоколам на цифровом колориметре AP-700 (Mobile photoelectric colorimeter. Япония). Также выполнено гистохимическое исследование печеночной паренхимы и соединительной ткани печени с использованием ШИК-реакции. Достоверность различий между группами оценена по t-критерию Стьюдента для независимых выборок. Проведены однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, где за независимую переменную брали влияние дозировки вводимого соединения и двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, где в качестве независимых переменных были взяты влияния вводимого лекарственного агента и длительности введения. Достоверными признавали различия при р <0,05. В работе данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего (М \pm SEM).

Результаты. Введение камфецина в течение 5 суток независимо от дозировки (25 мг/кг, 50 мг/кг) привело к достоверному повышению концентрации глюкозы в крови по сравнению с группами контроля и римантадина (р<0,05, рис. 1). Однофакторный дисперсионный анализ достоверного влияния показателей среди групп введения различных дозировок камфецина не показал ($F_{1.5}$ =2,25, p>0,05,

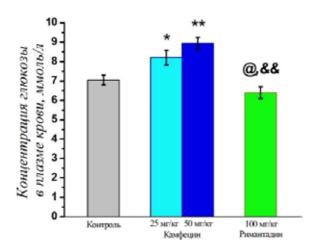


Рис. 1. Концентрация глюкозы в крови при введении лекарственных агентов в течение 5 суток. Примечание: * p<0,05, ** p<0,01 по сравнению с контролем; @ p<0,05 — по сравнению с группой введения камфецина в дозировке 25 мг/кг; && p<0,01 — по сравнению с группой введения камфецина в дозировке 50 мг/ кг.

табл. 1). Морфологическое исследование срезов печени, окрашенных ШИК-реакцией на выявление гликогена, указывает на то, что запасы гликогена, хранящиеся в гепатоцитах, в условиях эксперимента изменяются незначительно (рис.2).

Поскольку не было выявлено различий между контрольными группами 7 и 14 суток, в работе представлена единая контрольная группа. Камфецин при введении в дозировке 100 мг/кг в течение 7 суток вызвал гипергликемическую реакцию (p<0,05 по сравнению с контролем, p<0,05 по сравнению с 7-суточным введением римантадина, рис.3). При анализе двухфакторного дисперсионного комплекса фактор лекарственного агента оказал достоверное влияние на уровень глюкозы крови ($F_{1,18}$ =6,79, p<0,05, табл.2). При изучении особенностей отложения гликогена на срезах печени (рис.4), была выявлена тенденция к незначительному уменьшению выраженности окраски гепатоцитов у обеих групп камфецина по сравнению с контрольной.

Обсуждение и выводы. Известно, что камфора способна стимулировать гликолиз и аэробное окисление [6,7]. По-видимому, ее производные, получаемые в результате метаболизма камфецина в печени посредством цитохрома P-450, могут обладать схожими свойствами,

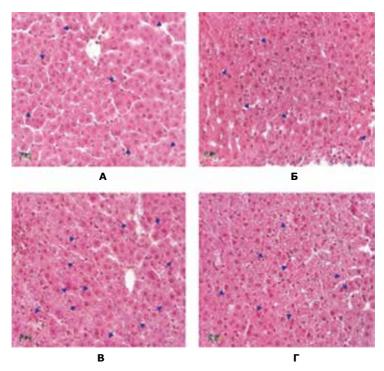


Рис. 2. Выявление отложений гликогена в паренхиме печени крыс: A — контроль, B — введение камфецина в дозировке 25 мг/кг массы тела, B — введение камфецина в дозировке 50 мг/кг массы тела; Γ — введение римантадина в дозировке 100 мг/кг массы тела. Стрелки — отложение гликогена. Окр. ШИК-реакцией, об. x20

что приводит к формированию гипергликемии при введении камфецина в течение 5 суток в дозировке 25 и 50 мг/кг и в течение 7 суток в дозировке 100 мг/кг. Отсутствие достоверного повышения концентрации глюкозы в плазме крови в группе камфецина 14 суток по сравнению с остальными группами может являться следствием восстановления физиологичного соотношения инсулин/глюкагон, которое обеспечивает нормальный уровень глюкозы крови. Выявленное отсутствие качественных различий в локализации гликогена на срезах печени у всех экспериментальных групп крыс позволяет сделать заключение о том, что возможное активационное влияние камфорной части молекулы камфецина на процессы гликолиза не оказывает существенного влияния на запасающую функцию печени [7].

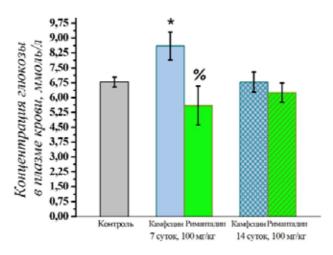


Рис. 3. Концентрация глюкозы в плазме крови при введении лекарственных агентов 7 и 14 суток. Примечание: * p < 0.05 по сравнению с группой контроля; p < 0.05 по сравнению с группой введения камфецина в течение 7 суток

Таким образом, выраженный гипергликемический эффект камфецина при использовании дозировок 25, 50 (в течение 5 суток) и 100 мг/кг (в течение 7 суток) исчезает при введении в течение 14 суток. Незначительное изменение отложений гликогена свидетельствует в пользу безопасного влияние камфецина на структурные корреляты углеводного обмена.

Таблица 1. Анализ однофакторного дисперсионного комплекса. Концентрация глюкозы плазмы крови в условиях введения камфецина в различных дозировках в течение 5 суток, ммоль/л

Источник изменчивости	Сумма квадратов отклоне- ний, SS	Степени свободы, df	Средний квадрат, MS	F- критерий	p
Дозировка камфецина (25 мг/кг и 50 мг/кг)	0,95	1	0,95	2,25	0,19
Ошибка	2,12	5	0,42		

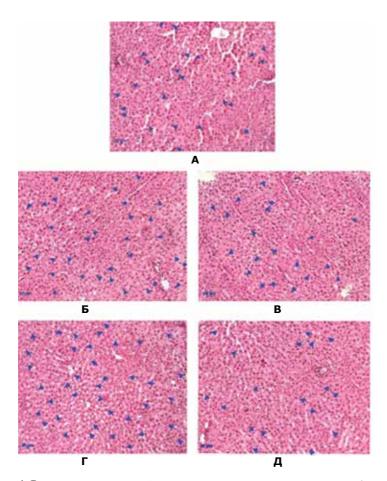


Рис. 4. Выявление отложений гликогена в паренхиме печени крыс: A — контроль, B — введение камфецина в течение 7 суток, B — введение римантадина в течение 7 суток, Γ — введение камфецина в течение 14 суток, Γ — введение римантадина в течение 14 суток. Стрелки — отложение гликогена. Окр. ШИК-реакцией, об. x20

Примечание: жирным шрифтом выделены значения p < 0.05.

Таблица 2. Анализ двухфакторного дисперсионного комплекса. Концентрация глюкозы плазмы крови в условиях введения камфецина и римантадина в течение 7 и 14 суток, Ед/л

Источник изменчивости	Сумма квадра- тов отклоне- ний, SS	Степени свободы, df	Средний квадрат, MS	F- критерий	p
Введение лекар- ственных агентов	16,76	1	16,76	6,79	0,02
Длительность введения (7 и 14 суток)	1,86	1	1,86	0,75	0,39
Взаимодей- ствие факторов введения агентов и длительности введения	8,30	1	8,30	3,36	0,08
Ошибка	44,44	18	2,47		

Примечание: жирным шрифтом выделены значения р < 0,05

Список литературы

- 1. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, Wang D, Nelson EA, Li F Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. // MBio -2014-5(2)-P.14-31.
- 2. Zarubaev V.V., Garshinina A.V., Tretiak T.S., Fedorova V.A., Shtro A.A., Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Salakhutdinov N.F. Discovery of a new class of antiviral compounds: Camphor imine derivatives // European Journal of Medicinal Chemistry 2015-105-P. 263-273.
- 3. Yarovaya O.I., Sokolova A.S, Shernyukov A.V., Pokrovsky M.A., Pokrovsky A.G, Lavrinenko V.A, Zarubaev V.V., Tretiak T.S, Anfimov P.M., Kiselev O.I., Beklemishev A.B., Salakhutdinov N.F. New quaternary ammonium camphor derivatives and their antiviral activity, genotoxic effects and cytotoxicity // Bioorg. Med. Chem. 2013 21 P.6690-6698.
- 4. Rogachev A.D., Yarovaya O.I., Fatianova A.V., Lavrinenko V.A., Amosova E.V., Zarubaevc V.V., Pokrovsky A.G., Salakhutdinova N.F. Untargeted search and identification of metabolites of antiviral agent camphecene in rat urine by liquid chromatography and mass spectrometry and studying their distribution in organs following peroral administration of the compound // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2018 161 P.383 392.

- 5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна: Изд. Умеренков, 2010.
- 6. Венгеровский.А.И. Фармакология. Курс лекций: учеб. пособие 4-е изд., перераб. и доп. М.:ГЭОТАР-Медиа,2015. 736 с.
- 7. Shokova EA, Kim JK and Kovalev VV. Camphor and Its Derivatives. Unusual Transformations and Biological Activity. Russian Journal of Organic Chemistry. 2016; 52 (4): 459–488.
- 8. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера [Электронный ресурс]: в 3 т. Т. 1: Основы биохимии, строение и катализ / Д. Нельсон, М. Кокс; пер. с англ. 2-е изд. (эл.). М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015 C.751.
- 9. Moore MC, Coate KC, Winnick JJ, An Z. & Cherrington AD. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. Adv. Nutr. 2012; 3: 286–294
- 10. Dimitriadis G. Newsholme E. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on the control of blood glucose concentrations. In D. LeRoith, S. Taylor, & J. Olefsky (Eds.), Diabetes mellitus: A fundamental and clinical text.2004; 3rd ed: 183–197. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins

УДК 616.24-007.272-036.12-092:616-005.4:616-053

Самохина Л.М., Крахмалова Е.О., Антонова И.В.

ГУ «Национальный институт терапии
им. Л.Т.Малой НАМН Украины», Харьков
lub.samokhina@gmail.com

Возрастные аспекты изменений общей антиоксидантной активности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и ишемической болезнью сердца с учетом частоты обострений ХОБЛ

У пациентов среднего и пожилого возраста с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и ишемической болезнью сердца отмечены тенденции снижения/повышения общей антиоксидантной активности (ОАА) на фоне увеличения частоты обострений. У пациентов старческого возраста отмечено снижение ОАА на фоне увеличения частоты обострений ХОБЛ от 1 до 2.

Ключевые слова. Общая антиоксидантная активность, обострения хронической обструктивной болезни легких, ишемическая болезнь сердца, возраст.

Samokhina L.M., Krakhmalova E.O., Antonova I.V. GD «National Institute of Therapy of L.T. Malaya name of NAMS of Ukraine», Kharkov

Age aspects of changes in the total antioxidant activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and ischemic heart disease taking into account the frequency of COPD excernation

In middle-aged and elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and ischemic heart disease, there were tendencies to decrease / increase in total antioxidant activity (TAA) against the background of an increase in the frequency of exacerbations. In old age patients, a decrease in TAA was noted against the background of an increase in the frequency of exacerbations of COPD from 1 to 2.

Key words. Total antioxidant activity, exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, ischemic heart disease, age.

Механизмы развития обострений хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) является достаточно разнообразными и сложными [1]. Как причинный фактор основное значение имеют бактерии, вирусы (особенно риновирусы), определенную роль играют и неинфекционные факторы внешней среды (поллютанты, температурные колебания). Выделяют лиц с повышенной восприимчивостью к обострениям — фенотип ХОБЛ с частыми обострениями. Эти эпизоды характеризуются взрывом воспаления дыхательных путей, увеличением окислительного стресса [1, 2]. Высокие уровни окислительного стресса наблюдаются и при стабильном течении патологического процесса [3]. Повышенный оксидативный стресс во время обострений сопровождается уменьшением общей антиоксидантной активности (ОАА) [3, 4]. Может наблюдаться и низкая продукция активных форм кислорода или повышение ОАА и содержания продуктов перекисного окисления липидов [4].

Обострения ХОБЛ ассоциируют с достоверным увеличением относительного риска сердечно-сосудистых событий (инфаркт миокарда, ишемический инсульт или транзиторные ишемические атаки). При ХОБЛ в сочетании с ишемической болезнью сердца (ИБС) оксидативный стресс представляет более выраженную активацию свободно-радикального окисления (СРО) и следующую за ним ре-

акцию тканей и систем организма [5]. При стенокардии, после каждого эпизода транзиторной ишемии, реперфузия миокарда сопровождается значительной активацией СРО и выбросом липопероксидов в кровь, антиоксидантная защита крови снижается.

Антивоспалительные эффекты стандартной терапии сопровождаются увеличением ОАА в мокроте на 70% при восстановлении по сравнению с обострением [3]. При этом характер изменений ОАА у пациентов с ХОБЛ с различной частотой обострений может иметь разную степень выраженности, непосредственно отражаться на эффективности стандартной терапии.

Кроме того, при ХОБЛ в сочетании с ИБС отмечены изменения системы оксиданты / ОАА с возрастом [4].

Цель работы: исследовать ОАА у пациентов с ХОБЛ разного возраста с различной частотой обострений и сопутствующей ИБС.

Материалы и методы исследования. Обследовано 67 больных ХОБЛ в сочетании с ИБС, из них 26-c нечастыми обострениями ХОБЛ и 37-c частыми обострениями. Пациентами с ХОБЛ, склонными к частым обострениям, принято считать больных $c \ge 2$ эпизодами обострений в течение календарного года. Контрольная группа — 12 практически здоровых людей.

Наличие и степень тяжести ХОБЛ устанавливали в соответствии с критериями GOLD (Global initiative for ChronicObstructive Lung Disease, 2018), диагноз ИБС — согласно рекомендациям Европейского общества кардиологов (The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology and European Atherosclerosis Society, 2011).

Всем больным проведено общеклиническое обследование, которое включало: сбор жалоб, анамнез, объективный осмотр, антропометрические измерения — рост, вес, вычисление индекса массы тела, сбор данных с помощью опросников по шкале выраженности одышки mMRC (modified Medical Research Council), Борга. Исследование функции внешнего дыхания проводили утром натощак на аппарате «Спироком профессиональный» (Украина) ТУ У 33.1-02066769-005-2002 № 258 с анализом показателей объема форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), соотношения ОФВ1 / ФЖЕЛ (индекса Тиффно).

В исследование не включали больных ХОБЛ в фазе обострения, с тяжелой сердечной патологией.

ОАА определяли в сыворотке крови микроспектрофотометричним методом [6]. Метод основан на способности антиоксидантов, присутствующих в образце, подавлять окисление 2,2-азино-ди3-етилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты. Количество образованной окисленной ее формы определяли измерением оптической плотности. В качестве контрольного материала использовали растворы тролокса 2,5-500 мкм. Антиоксиданты, присутствующие в образце, снижают абсорбцию пропорционально их концентрации. После остановки реакции добавлением 50 мкл / лунку 50 % серной кислоты осуществляли учет оптической плотности контрольных и опытных образцов с помощью микропланшетного анализатора ImmunoChem-2100 (США) при длине волны 630 нм.

Статистическую обработку данных проведено методом Стьюдента-Фишера с использованием лицензионного программного обеспечения «Microsoft Excel».

Результаты и обсуждение. Отмечено, что ОАА ниже по сравнению со здоровыми лицами у больных ХОБЛ без обострений и на фоне нечастых и частых (2) обострений ХОБЛ (таблица). Показано, что ОАА имеет тенденцию к увеличению на фоне обострений ХОБЛ и повышение числа обострений до 3-4 способствует существенному увеличению ОАА и приближению ее к таковому у здоровых лиц. Повышение ОАА в сыворотке крови на фоне обострений ХОБЛ согласуется с данными литературы и обусловлено, скорее всего, антивоспалительными эффектами стандартной терапии, сопровождающимися увеличением ОАА при восстановлении по сравнению с обострением [7].

Анализ ОАА с учетом возраста пациентов позволил выделить группы с нечастыми и частыми (2) обострениями 3 категорий: зрелого (среднего) возраста (2 период): мужчины 36—60 лет, женщины 36—55 лет; пожилого возраста 56/61 — 75 лет и старческого возраста 76—90 лет. В контроле выявлены оба периода среднего возраста, при этом с увеличением возраста (2-й период) отмечено, что ОАА имеет тенденцию к снижению. Группы без обострений и с 3—4-обострениями оказались представленными одной возрастной категорией — пожилыми лицами. При этом указанные выше тенденции изменений ОАА на фоне обострений (снижение/повышение) отмечены у среднего и пожилого возраста. У пациентов старческого возраста отмечено снижение ОАА на фоне увеличения частоты обострений от 1 ло 2.

Таблица. Общая антиоксидантная активность у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и ишемической болезнью сердца с учетом частоты обострений ХОБЛ и возраста

Исследуемая группа	Возраст, п	ОАА, мкМ	Возраст, п	ОАА, мкМ
Varionari	29-50	205 5 20 0	29-35 n=4	406,2±18,7
Контроль	n=12	385,5±30,8	36-50 n=8	370,3±49,7
0 — без обо- стрений	60-72 n=4	287,1±47,9**	60-72 n=4	287,1±47,9
1 — фенотип		310,0±14,9***	45-60 n=11	331,3±16,0
ХОБЛ с не- частыми обо- стрениями	45-78 n=26		56-73 n=13	283,8±24,0
			77-78 n=2	362,5±62,5
2 — фено-	27.04	37-60 n=8 3	359,3±30,9	
тип ХОБЛ с частыми обо- стрениями	37-84 n=31	332,9±16,8***	59-74 n=18	336,8±22,0
3-4 — фенотип ХОБЛ с частыми обострениями	58-70 n=6	345,8±43,5	58-70 n=6	345,8±43,5

^{**,*** —} степень вероятности различий по сравнению с контролем <0,01, <0,001 соответственно.

Старение обычно связано с прогрессивным нарушением окислительно-восстановительного баланса, приводит к повреждению в результате окислительного стресса [8]. Естественный процесс старения способствует образованию свободных радикалов и активных форм кислорода, которые стимулируют воспалительные процессы [9]. Накопление стареющих клеток может вызвать хроническое воспаление, которое может способствовать патологическим изменениям в пожи-

лых людей [10]. С возрастом возникает эндотелиальная дисфункция, утолщение интимы, деградация эластина и накопление коллагена и протеогликанов [11]. Увеличение жесткости крупных артерий приводит к увеличению систолического артериального давления и независимо связано с риском сердечно-сосудистых заболеваний.

Выявленные изменения ОАА у пациентов на фоне обострений ХОБЛ в сочетании с ИБС, стабильной стенокардией, позволяют обеспечить индивидуальный подход с учетом возрастного фактора к назначению терапии. В частности, это касается противовоспалительного и сердечно-защитного действия комбинаций препаратов Рофлумиласт – ингибитора фосфодиэстеразы 4 типа, нестероидного противовоспалительного средства, направленного на устранение воспалительных процессов, связанных с ХОБЛ, и кверцетина, обладающего антиоксидантными, мембраностабилизирующими и противовоспалительными эффектами [4]. Эффективность этого препарата можно ожидать у пациентов без обострений и при наличии фенотипа с нечастыми обострениями и 2-мя/год обострениями. Что касается пациентов с ХОБЛ в сочетании с ИБС с частыми 3-4/год обострениями, то применение комбинированного препарата аскорил ("Гленмарк Фармасьютикалз Лтд", Индия) в стадии обострения, может быть эффективным в оказании бронхолитического и отхаркивающего действия без выраженного отрицательного действия на сердечную норму [4, 12].

Следует отметить, что с возрастом уже у пожилых людей с множественными сочетанными патологиями лекарственные средства не могут давать такие же преимущества, которые наблюдаются у пациентов моложе или без мультиморбидности [4, 13]. Отмеченное нами значительное снижение ОАА у лиц старческого возраста делает актуальным поиск доступных алгоритмов лечения сочетанной патологии, в частности с усилением антиоксидантного эффекта.

Список литературы

- 1. Molecular mechanisms of inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / A.L. Kersul [et al.] // Arch. Bronconeumol. 2011. Vol. 47, № 4. P.176-183. doi: 10.1016/j. arbres.2010.12.003.
- 2. Дмитриева О.А., Шерстюк Б.В. Влияние стрессиндуцированного снижения уровня тестостерона на гистохимические изменения половых органов крыс // Pacific Medical Journal. 2007, No. 3. P. 55–57.

- 3. Верткин А.Л., Моргунов Л.Ю., Шахманаев Х.А. Гипогонадизм и хроническая обструктивная болезнь легких // Урология: научнопрактический журнал. 2013. N 5. C. 116-122.
- 4. Крахмалова Е.О., Самохина Л.М., Харченко Ю.Е. Антиоксидантная активность у пациентов с хроническим обструктивным заболеванием легких и ишемической болезнью сердца // Укр. терапевт. журн. 2018. №3. С.62-72.
- 5. Поплавская Э.Э., Лис М.А. Состояние функции эндотелия и активность фагоцитоза при хронической обструктивной болезни легких и ишемической болезни сердца // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2010. Т. 29, № 1. С. 29–31.
- 6. Efficient Assay for Total Antioxidant Capacity in Human Plasma Using a 96-Well Microplate / Y. Kambayashi [et al.] // J. Clin. Biochem. Nutr. 2009. Vol. 44, № 1. P.46–51.
- 7. Low-dose theophylline enhances the anti-inflammatory effects of steroids during exacerbations of COPD / B.G. Cosio [et al.] // Thorax. 2009. Vol. 64, \mathbb{N} 5. P.424-429. doi: 10.1136/thx.2008.103432.
- 8. Calpain inhibitor A–705253 mitigates Alzheimer's disease—like pathology and cognitive decline in aged 3xTgAD mice / R. Medeiros [et al.] // Am. J. Pathol. 2012. Vol. 181, \mathbb{N}_2 2. P. 616–625.
- 9. Pillai S., Oresajo C., Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation—induced matrix degradation a review // Int. J. Cosmet. Sci. 2005. Vol. 27, № 1. P. 17—34.
- 10. Wei W, Ji S. Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity // J Cell Physiol. 2018. Vol. 233, № 12. P. 9121-9135. doi: 10.1002/jcp.26956.
- 11. Lee S.J., Park S.H. Arterial ageing // Korean Circ. J. 2013. Vol. 43, № 2. P. 73–79.
- 12. Комбинированный препарат аскорил при лечении больных хронической обструктивной болезнью легких с сопутствующей ишемической болезнью сердца / Н.Ю. Григорьева. [и др.] // Терапевтический архив. 2013. Т. 85, \mathbb{N} 8. С. 91-94.
- 13. Ахминеева А.Х. Биохимические маркеры дисфункции эндотелия при хронической обструктивной болезни легких в сочетании с гипертонической болезнью, ишемической болезнью сердца // Терапевтический архив. 2014. №3. С. 20-23

УДК 616.61:616.379-008.64-092:616.12-008.331.1:546.41:546.18 Самохина Л.М., Топчий И.И., Кириенко А.Н.

ГУ «Национальный институт терапии им. Л.Т. Малой НАМН Украины», Харьков lub.samokhina@gmail.com

Фосфор и кальций на фоне прогрессирования диабетической нефропатии, сочетанной с артериальной гипертензией

Концентрация фосфора прямо коррелирует со снижением показателя диастолической функции левого желудочка Е/А. При диабетической нефропатии IV стадии наблюдается повышение уровня Са, которое отмечают на фоне недостаточной выделительной функции почек и снижения фильтрации, развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, нарушения структуры сердца.

Ключевые слова: кальций, фосфор, клинические показатели, количественная эхокардиография, диабетическая нефропатия с артериальной гипертензией.

Samokhina L.M., Topchiy I.I., Kiriyenko A.N. GD «National Institute of Therapy of L.T. Malaya name of NAMS of Ukraine», Kharkov

Phosphorus and calcium on the background of progression of diabetic nephropathy combined with arterial hypertension

The phosphorus concentration directly correlates with the decrease in the indicator of left ventricular diastolic function E / A. In stage IV diabetic nephropathy, an increase in Ca levels is observed, which is noted against the background of insufficient renal excretory function and a filtration decrease, the development of unfavorable cardiovascular events, and disturbances of the heart structure.

Key words: calcium, phosphorus, clinical parameters, quantitative echocardiography, diabetic nephropathy with arterial hypertension.

Скорость прогрессирования хронической болезни почек (ХБП) демонстрирует значительную изменчивость между индивидуумами и зависит от нескольких факторов [1]. Классические факторы риска (например, возраст, пол, этническая принадлежность, семейная

история ХБП, сахарный диабет, метаболический синдром, протеинурия и гипертония) не могут объяснить некоторые результаты. Поэтому внимание смещается на более важные факторы, среди которых метаболизм фосфата кальция.

Фосфор, незаменимый микроэлемент, тесно связан с клеточным метаболизмом глюкозы в процессе выработки энергии; неорганический фосфат сыворотки крови часто транспортируется в клетки вместе с глюкозой во время инсулиновой терапии [2]. Митохондриальная дисфункция и апоптоз, стресс эндоплазматического ретикулума, дегенерация нейронов и рак поджелудочной железы связаны с нарушением регуляции уровня фосфатов при диабете. А при диабетических осложнениях, включая сосудистую кальцификацию, нефропатию, ретинопатию и костные заболевания, распространена эктопическая кальцификация, включающая осаждение кристаллов фосфата кальция.

Ранее показано, что у пациентов с диабетической нефропатией (ДН), как и без сахарного диабета (СД), с гипертонической болезнью (ГБ) в анамнезе концентрация кальция в сыворотке крови находится в основном в рамках верхнего предела контрольного диапазона [3]. При ДН наблюдают и повышение, и снижение концентрации кальция, что предполагают, может быть обусловлено Са2+-связанными возрастными изменениями, аккумуляцией кальция в сосудах. При ДНІІ, сочетанной с артериальной гипертензией (АГ), отмечают повышение концентрации кальция у мужчин, а при прогрессировании ДН до III-IV стадии — снижение, что связывают со структурно-функциональными изменениями сосудов (увеличение комплекса интима-медиа, кальцификация) [4]. При ДНІІІ-IV, по сравнению с лицами без СД, также наблюдают снижение концентрации фосфора, что, в свою очередь, связывают с наличием артериальной гипертензии, ухудшением возможности физиологического контроля систолического артериального давления с возрастом. Высокие концентрации фосфора в сыворотке крови считают общепризнанным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и кальцификации сосудов как у пациентов с ХБП, так и среди населения в целом [5].

Цель данного исследования: изучить взаимосвязи изменений содержания кальция, фосфора и отдельных клинических показателей на фоне прогрессирования ДН у больных с АГ.

Материалы и методы исследования. Обследовано 68 больных СД 2-го типа в сочетании с ДН II-IV стадий и АГ в анамнезе до лечения (44 женщин и 24 мужчин), а также 30 человек группы сравнения — без СД с АГ в анамнезе (16 женщин и 14 мужчин). Группа больных состояла из лиц в основном среднего или зрелого и пожилого возраста.

Стадию ДН устанавливали согласно классификации С. Mogensen (1981 г.), стадию АГ или вторичной артериальной гипертензии — согласно рекомендациям ВОЗ и Международной ассоциации гипертензии (2007 г.). Всем больным проведено общеклиническое обследование, которое включало сбор жалоб, анамнез болезни и жизни, общепринятые физикальные методы исследования (осмотр, перкуссия и аускультация). Морфологические изменения сонных сосудов оценивали методом количественной эхокардиографии на ультразвуковом сканере Ultima PA (Radmir, UA) с линейным датчиком с частотой 5-10 МНz. Лабораторное исследование включало клинические анализы крови и мочи, суточную экскрецию белка с мочой; общие биохимические — липидный спектр крови, уровень трансаминаз, глюкозы, мочевины и креатинина, концентрацию мочевой кислоты крови. Обследования проводили при госпитализации больного. От всех обследованных лиц было получено информированное согласие на участие в исследовании и использование их биопроб.

В сыворотке крови исследовали концентрацию кальция и фосфора с использованием набора реагентов Согтау (Польша). Измеряли оптическую плотность с использованием полуавтоматического биохимического анализатора СНЕМ-7 фирмы ERBA Mannheim (Чехія). Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента-Фишера с помощью программного обеспечения Excel.

Результаты и их обсуждение. Показано, что группы больных состоят из пациентов обоих полов, соизмеримы по возрасту, представлены преимущественно лицами среднего и пожилого возраста (табл. 1 и 2). У группы ДНІІ выявили большие величины систолического артериального давления (САД) и диастолического АД (ДАД), отсутствие белка в моче, снижение диастолической функции левого желудочка — отношения ранней и поздней скорости движения Е/А, конечного диастолического размера (КДР) (табл. 1).

У больных ДНПІ остаются неизменными повышенное ДАД, низкие значения Е/А, снижается креатинин, фракция выброса (ФВ), и отмечены более высокие значения толщины задней стенки (ТЗС) по сравнению с группой ГБ. И наконец, при ДНІV отмечены изменения всех указанных показателей за исключением Е/А, которое достигает уровня, отмеченного в группе сравнения. При ДНІV нами показано увеличение САД, ДАД, частоты сердечных сокращений (ЧСС), суточного белка в моче, креатинина, мочевины, левого предсердия, КДР, толщины комплекса интима/медия правой общей сонной артерии или межжелудочковой перегородки (ТМЖП), ТЗС на фоне значимого снижения ФВ.

Таблица 1. Клинические показатели больных диабетической нефропатией с гипертонической болезнью с учетом стадии ДН

	днп	дни	дніу	Группа сравнения ГБІІ
Возраст, лет	43-76	45-77	51-84	24-68
Пол	м=10, ж=6	м=4, ж=8	м=10, ж=13	м=14, ж=16
САД	186,0±4,8***	179,0±4,2	186,0±4,3***	175,7±3,5
ДАД	119,0±6,7***	109,0±2,3***	102,0±2,5*	96,1±4,2
ЧСС	77,9±2,0	81,6±4,3	83,4±2,7**	79,8±2,1
Суточный белок, г/л	0***	0,006±0,003	0,11±0,03***	0,005±0,002
Креатинин, мкмоль/л	89,0±4,5	86,1±2,1*	121,0±12,6 ***	91,8±3,0
Мочевина, ммоль/л	5,4±0,4	6,3±0,6	8,5±0,7***	6,1±0,3
Размер левого предсердия, см	3,7±0,1	-	4,5±0,3*	3,93±0,10
КДР, см	5,01±0,09*	5,17±0,12	5,47±0,07***	5,16±0,10
Тмжп, см	1,16±0,02	1,20±0,02	1,71±0,25***	1,18±0,07
Тзс, см	1,19±0,04	1,22±0,03*	1,60±0,23***	1,09±0,09
ФВ,%	57,4±1,0	54,2±2,3***	48,9±3,0***	58,1±1,2
E/A	0,86±0,06***	0,94±0,11***	1,09±0,12	1,20±0,05

^{*, **, *** —} степень вероятности различий с группой сравнения <0,05,<0,01,<0,001, соответственно.

Повышение концентрации кальция отмечено при ДНІV, а снижение содержания фосфора — независимо от стадии ДН (табл. 2); при

этом следует отметить, что изменение концентрации фосфора практически прямо коррелирует со снижением E/A (при ДНІV недостоверно).

Таблица 2. Концентрация кальция и фосфора (ммоль/л) в сыворотке крови больных диабетической нефропатией с гипертонической болезнью

	n	Муж- чины	Жен- щины	Воз-	Концентра- ция каль- ция, х+тх (ммоль/л)	Концентрация фосфора, х+тх (ммоль/л)
Группа сравнения ГБП	20	9	11	37-87	2,87±0,18	2,80±0,98
дни	23	12	11	38-74	2,98±0,19	1,39±0,09***
днии	18	5	13	38-77	2,86±0,27	1,39±0,08***
ДНІV	27	7	20	48-84	3,08±0,15*	1,42±0,08***

^{*, *** -} степень вероятности различий с группой сравнения < 0.05, < 0.001, соответственно.

Средние уровни фосфата в сыворотке крови входят в число показателей, связанных с более быстрым снижением функции почек при прогрессирующей ХБП (стадии 4-5) [1]. У пациентов с ГБ отмечают более ускоренное нарушение функции почек, пропорционально количеству антигипертензивных препаратов, хотя эта связь не значимая при многомерном анализе.

Повышение САД, ДАД и снижение уровня эхокардиографического маркера сердечно-сосудистого риска Е/А на фоне ДН разных стадий является отражением сопутствующей АГ. Кроме того, повышение системного АД признано в качестве важного фактора прогрессирования ХБП [1]. А отсутствие изменений Е/А по сравнению с группой сравнения при ДНІV может свидетельствовать о нормализации диастолической функции левого желудочка. При этом с прогрессированием ДН до IV стадии увеличивается ЧСС. Учащенное

сердцебиение — это компенсация сердечной недостаточности. Слабое сердце не может выбросить за одно сокращение нужный объем крови, поэтому ему приходится сокращаться несколько раз.

Изменения уровней биохимических показателей, отражающих функциональное состояние почек, суточного белка, креатинина, мочевины, позволяют их связать непосредственно с прогрессированием ДН до IV стадии. Повышение уровня белка, выделяемого с мочой, сверх указанного порога свидетельствует о патологическом характере протеинурии, причиной которой могут стать нарушение клубочковой фильтрации, всасывания белка в канальцах нефрона. Превышение содержания мочевины связывают с недостаточной выделительной функцией почек и нарушением фильтрации. И наконец, увеличение концентрации креатинина в сыворотке крови говорит об уменьшении уровня почечной фильтрации. В условиях уменьшения почечной перфузии повышение сывороточного креатинина (31%) происходит медленнее, чем повышение уровня мочевины (39%). Креатинин не рассматривают как чувствительный индикатор при повреждениях почек легкой или умеренной степени. У пациентов с прогрессирующей ХБП сывороточные значения креатинина и скорость клубочковой фильтрации могут широко варьировать [1]. Главная ценность определения сывороточного креатинина — это диагностика почечной недостаточности.

Увеличение размеров левого предсердия (ЛП) ассоциируется с развитием неблагоприятных сердечно-сосудистых событий и нами отмечено на IV стадии ДН. ЛП выполняет три основные физиологические функции, влияющие на наполнение левого желудочка (ЛЖ) и его функцию [6]. ЛП функционирует как насос, обеспечивающий 15-30% наполнения ЛЖ, как резервуар для венозного возврата из легких во время систолы желудочков и как кондиут, обеспечивающий поток крови из ЛП в ЛЖ в фазу ранней диастолы. Увеличение размеров ЛП прямо коррелируют с такими параметрами структуры сердца, как КДР, ТМЖП, а также ТЗС. При этом ТЗС увеличивается, а ФВ уменьшается еще на III стадии ДН.

Повышение уровня Са при ДНІV наблюдается на фоне недостаточной выделительной функции почек и снижения фильтрации (по данным биохимических критериев), развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, нарушения структуры сердца. Возможность распознавать изменения этих предикторов у больных с ДНІІ на фоне сопутствующей АГ позволит идентифицировать пациентов с высоким риском, снизить скорость прогрессирования ДН в результате лечения [1].

Список литературы

- 1. Factors related with the progression of chronic kidney disease / C. Yuste [et al.] // Nefrologia. 2013. V. 33. № 5. P. 685-691.
- 2. Brown R.B. Diabetes, diabetic complications, and phosphate toxicity: a scoping review // Curr Diabetes Rev. 2019. Nov 3. doi: 10.2174/15733998 15666191104113236.
- 3. Самохина Л.М., Топчий И.И., Кириенко А.Н. Возрастные и гендерные особенности течения диабетической нефропатии и гипертонической болезни // Scientific achievements of modern society. Abstracts of the 5th International scientific and practical conference. Cognum Publishing House. Liverpool, United Kingdom. 2020. Pp. 859-869. URL: http://sci-conf.com.ua.
- 4. Самохина Л.М., Топчий И.И., Кириенко А.Н. Кальций и фосфор при диабетической нефропатии, сочетанной с артериальной гипертензией, на фоне традиционной терапии // Леч. дело (Минск, Беларусь). 2019. Т. 66, № 2. С. 49-53. www.lech-delo.by
- 5. Muras K., Masajtis-Zagajewska A., Nowicki M. Diabetes modifies effect of high-phosphate diet on fibroblast growth factor-23 in chronic kidney disease // J Clin Endocrinol Metab. 2013. V. 98, № 12. E1901-1908. doi: 10.1210/jc.2013-2418.
- 6. Рекомендации по количественной оценке структуры и функции камер сердца / R.M. Lang [et al.] // Росс. Кард. Журн. 2012. Т. 95, № 3. Приложение 1. С. 1-28.

УДК 547.979.733

Старцева О.М.¹, Пылина Я.И.², Расова Е.Е.², Белых Д.В.³

СГУ им. Питирима Сорокина¹, Сыктывкар

Институт биологии

ФИЦ Коми научного центра УрО РАН², Сыктывкар

Институт химии

ФИЦ Коми научного центра УрО РАН³, Сыктывкар

от startseva@mail.ru

Синтез и цитотоксическая активность металлокомплексов с фрагментом диэтиленгликоля

Синтезированы порфиринаты переходных металлов на основе производных хлорофилла, а с фрагментами диэтиленгликоля на периферии макроцикла, изучено влияние положения полиэфирного фрагмента, наличие

и природы катиона металла на цититоксическую активность полученных соединений по по отношению к клеткам линии HeLa.

Ключевые слова: порфиринаты переходных металлов, хлорин e_6 , пирофеофорбид а, метилфеофорбид а, диэтиленгликоль, фотонезависимая цитотоксическая активность.

Startseva O.M.¹, Pylina Y.I.², Rasova E.E.², Belykh D.V.³
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pitirim Sorokin Syktyvkar State University»¹, Syktyvkar Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences², Syktyvkar Institute of Chemistry of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences³, Syktyvkar

Synthesis and cytotoxic activity of metal complexes with a fragment of diethylene glycol

Porphyrinates of transition metals have been synthesized based on derivatives of chlorophyll a with diethylene glycol moieties on the periphery of the macrocycle. The influence of the position of the polyester fragment, the presence and nature of the metal cation on the cytotoxic activity of the obtained compounds towards HeLa cells has been studied.

Key words: Porphyrinates of transition metals, chlorin e_6 , pyropheophorbide a, methylpheophorbide a, diethylene glycol, photoindependent cytotoxic activity.

Производные хлорофилла a являются перспективными соединениями для получения биоактивных соединений. Некоторые комплексы хлорофилла a с переходными металлами используются в медицине в качестве Φ С для Φ ДТ [1-3]. Для повышения биодоступности таких Φ С на перифериию макроцикла можно внедрить фрагменты олигоэтиленгликолей [4-5].

В данной работе были получены новые комплексы переходных металлов (меди, цинка и никеля) с фрагментом диэтиленгликоля (ДЭГ) на периферии макроцикла (Cu-1, Cu-3, Ni-1, Ni-3, Zn-1, Zn-3, схема 1) и исследована темновая цитотоксическая активность этих комплексов (Cu-2, Ni-2, Zn-2) в сравнении с соответствующими безметальными хлоринами (1-3) [6].

Безметальные соединения с ДЭГ в различных положениях макроцикла были получены согласно описанным нами ранее методикам [4].

Схема 1. *i*: ДЭГ- H_2 SO₄(конц), комн. темп. 12-16 ч [4]; *ii*: CMPI, DMAP, толуол, кипячение 60 мин [4]; *iii*: коллидин, кипячение, 30-40 мин [4]; *iv*: CH₃NH₂/H₂O, ТГФ, комн. темп., 1-2 ч [4]; *v*: Cu(OAc)₂ или Zn(OAc)₂, CHCl₃-CH₃OH, комн. темп., 60 мин; *vi*: Ni(OAc)₂, AcAc, толуол, кипячение 10 мин.

Синтез комплексов меди и цинка (Cu-1, Cu-2, Cu-3, Zn-1, Zn-2, Zn-3) проводился действием ацетата соответствующего металла в смеси хлороформа с метанолом. Комплексы никеля (Ni-1, Ni-2, Ni-3) были получены кипячением ацетата никеля с ацетилацетоном в толуоле. Спектральные характеристики исходных хлоринов (1-3) и ранее описанных комплексов (Cu-2, Ni-2, Zn-2) соответствуют литературным данным [2,4]. Строение неописанных ранее комплексов (Cu-1, Cu-3, Ni-1, Ni-3, Zn-1, Zn-3) подтверждено данными масс-спектрометрии, ИК и электронной спектроскопии и, в случае комплексов никеля и цинка, спектроскопии ЯМР ¹Н.

Было проведено исследование влияния положения фрагмента ДЭГ, наличия и природы катиона металла (Cu^{2+},Zn^{2+},Ni^{2+}) на цитотоксичность производных хлорофилла a по отношению к клеткам линии HeLa. Выявлено, что внедрение катиона цинка повышает цитотоксичность для низкотоксичных безметальных хлоринов и слабо влияет в случае относительно токсичных хлоринов. Внедрение катионов никеля и меди оказывает малое влияние на цитотоксичность. Наибольшую активность проявляют хлорины и порфиринат цинка на основе диэтиленгликолевого эфира пирофеофорбида a.

Список литературы

- 1. Wongsinkongman P., Brossi A., Wang H.-K., Bastow K.F., Lee K.H. // Bioorg. Med. Chem. 2002. 10. 583–591.
- 2. Tarabukina I.S., Pylina Ya.I., Velegzhaninov I.O., Startseva O.M., Shadrin D.M., Belykh D.V. // Butlerovskie Soobshcheniya (Butlerov Commun.) 2015. 43(7). 18–23.
- 3. Pylina Y.I., Shadrin D.M., Shevchenko O.G., Khudyaeva I.S., Belykh D.V., Velegzhaninov I.O. // Macroheterocycles 2017. 10. 279–288.
- 4. Belykh D.V., Startseva O.M., Patov S.A. // Macroheterocycles 2014. 7. 401-413.
- 5. Berezin D.B., Soloduhin T.N., Shuhto O.V., Belykh D.V., Startseva O.M., Khudyaeva I.S., Kustov A.V. // Izv. Akad. Nauk, Ser. Khim. 2018. 7. 1273–1279.
- 6. Пылина Я.И., Старцева О.М., Расова Е.Е., Белых Д.В. // Macroheterocycles. 2019. 12(2). 165-170.

УДК 577.17

Степочкина А.М.^{1,2}, Бахтюков А.А.¹, Деркач К.В.¹, Голованова Н.Э.². Шпаков А.О.¹

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук¹, Санкт-Петербургский государственный университет

Санкт-Петербург², Россия

annastepochkina23.11@mail.ru, bahtyukov@gmail.com, derkatch_k@list.ru, nesh1764@mail.ru, alex shpakov@list.ru

Сравнительное изучение стимулирующего эффекта хорионического гонадотропина на тестикулярный стероидогенез у диабетических и стареющих крыс

Показано снижение стимулирующего эффекта хорионического гонадотропина человека на продукцию половых стероидных гормонов у крыс со стрептозотоциновым диабетом и у стареющих (18-тимесячных) животных, а также изменения соотношений прекурсоров тестостерона в семенниках, свидетельствующие о дифференцированном характере нарушений активности стероидогенных ферментов при диабете и старении.

Ключевые слова: тестикулярный стероидогенез, тестостерон, хорионический гонадотропин, диабет, старение.

Stepochkina A.M^{1,2}, Bakhtyukov A.A.¹, Derkach K.V.¹, Golovanova N.E.², Shpakov A.O.¹

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry¹, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg State University St. Petersburg², Russia

A comparative study of the stimulating effect of chorionic gonadotropin on testicular steroidogenesis in diabetic and aging rats

A decrease in the stimulating effect of human chorionic gonadotropin on the production of sex steroid hormones in rats with streptozotocin diabetes and in aging (18-month-old) animals, as well as the changes in the ratios of testosterone precursors in the testes, indicating a differentiated nature of impaired activity of steroidogenic enzymes in diabetes and aging, was shown.

Key words: testicular steroidogenesis, testosterone, chorionic gonadotropin, diabetes, aging.

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) является важнейшим регулятором стероидогенеза и широко применяется в медицине для коррекции андрогенной недостаточности. Его стероидогенное действие обусловлено способностью активировать фермент аденилатциклазу в клетках Лейдига, повышать внутриклеточный уровень цАМФ и стимулировать протеинкиназу А и зависимые от нее внутриклеточные пути [1]. В клетках Лейдига протеинкиназа А стимулирует транспортный белок StAR, осуществляющий перенос холестерина в митохондрии, где стартует синтез половых стероидных гормонов, а также активирует ряд стероидогенных ферментов, катализирующих синтез прекурсоров тестостерона (Т). При сахарном диабете (СД) и старении в семенниках усиливаются окислительные процессы, воспаление, стресс эндоплазматического ретикулума, что неизбежно ведет к нарушению функционирования аденилатциклазной системы и ухудшает процесс передачи через нее гонадотропинового сигнала [2,3]. Это является одной из причин снижения уровня Т у пожилых мужчин и пациентов с СД, приводит к андрогенной недостаточности, снижает фертильность [4-6]. Применение ХГЧ не всегда является эффективным, вследствие чего необходимо исследовать механизмы, лежащие в основе ослабления ответа тестикулярной системы на гонадотропиновую стимуляцию [1]. Целью работы было изучить влияние пятидневной терапии диабетических и стареющих самцов крыс с помощью ХГЧ на уровень Т в крови и на уровни и соотношение половых стероидных гормонов в семенниках животных.

Эксперименты проводили в соответствии с правилами, разработанными и утвержденными Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, и требованиями, изложенными в документах "European Communities Council Directive 1986" (86/609/EEC) и "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". В качестве контроля использовали четырехмесячных самцов крыс линии Wistar, в качестве стареющих — крыс возраста 18 месяцев. СД вызывали однократной обработкой трехмесячных крыс стрептозотоцином (50 мг/кг), после чего спустя 30 дней, на основании тестирования уровня глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови и оценки потребления пищи и воды, отбирали крыс с развившимся заболеванием — уровень постпрандиальной глюкозы через 2 ч после еды выше 15 ммоль/л, уровень HbA1c — выше 6 %. Уровень глюкозы определяли с помощью тест-полосок «One Touch Ultra» (США), уровень HbA1c с помощью наборов "Multi Test HbA1c System kit" ("Polymer Technology Systems, Inc.", США). Группам «Контроль+ХГЧ», «Диабет+ХГЧ» и «Старение+ХГЧ» (в каждой число животных n=5) в течение 5 дней вводили ХГЧ («Московский эндокринологический завод», Россия) в суточной дозе 20 МЕ/крысу, подкожно, в 11.00. Остальным животным в те же сроки вводили плацебо (физиологический раствор). В последний день эксперимента, через 3 ч после введения ХГЧ, животных наркотизировали и забирали у них кровь для определения уровня Т и семенники для оценки содержания Т и его прекурсоров. Уровень Т в крови также оценивали перед началом курса ХГЧ. Концентрацию Т в крови и семенниках определяли с помощью набора «Тестостерон-ИФА» («Алкор-Био», Россия). Содержание прогестерона, 17-оксипрогестерона и андростендиона в семенниках определяли с помощью наборов «Progesterone-EIA», «17-ОН-ргодеметопе-EIA» («ХЕМА Со. Ltd.», Россия) и «Androstenedione ELISA» («DRG Instruments GmbH», Германия).

Нами было показано, что базовый уровень Т в крови диабетических и стареющих крыс, а также стимулирующий эффект ХГЧ на продукцию Т у них были достоверно снижены в сравнении с соответствующими контрольными группами (табл. 1). При этом в группе «Диабет+ХГЧ» уровень Т был ниже, чем в группе «Старение+ХГЧ», что указывает на более выраженное ослабление чувствительности семенников к гонадотропину у диабетических крыс в сравнении со стареющими животными. Полученные данные свидетельствуют о развитии андрогенного дефицита при старении и СД и об ослаблении ответа тестикулярной стероидогенной системы на стимуляцию гонадотропинами с ЛГ-активностью.

На следующем этапе изучали содержание в семенниках крыс половых стероидных гормонов, Т и его прекурсоров — прогестерона, 17-оксипрогестерона и андростендиона. Синтез прогестерона из прегненолона осуществляет фермент 3β-гидроксистероиддегидрогеназа. В дальнейшем с помощью цитохрома P450 17A1 из прогестерона последовательно синтезируются 17-оксипрогестерон и андростендион, после чего андростендион с помощью 17β-гидроксистероиддегидроге назы превращается в Т [7].

У диабетических крыс было снижено базовое и стимулированное ХГЧ содержание андростендиона и Т и стимулированное гонадотропином содержание 17-оксипрогестерона. У стареющих крыс было снижено базовое содержание 17-оксипрогестерона, андростендиона и Т и стимулированное ХГЧ содержание 17-оксипрогестерона и Т (но не андростендиона) (рис. 1).

Таблица 1. Уровень тестостерона в крови контрольных, диабетических и стареющих самцов крыс до начала эксперимента и через пять дней введения гонадотропина

	Перед началом эксперимента	Через пять дней введения ХГЧ или плацебо	
	Концентрация тестостерона в крови, ${\rm HM,M\pm SEM,n=5}$		
Контроль	19,2±3,3	18,5±3,0	
Контроль + ХГЧ	17,4±3,1	85,4±7,9	
Диабет	5,8±1,0*	6,1±1,5*	
Диабет + ХГЧ	6,0±1,6*	40,4±5,7*	
Старение	8,8±1,4*	8,2±1,5*	
Старение + ХГЧ	8,1±1,8*	59,2±2,2*	

 $^{^*}$ — различия между группами контрольных крыс и соответствующими им группами диабетических и стареющих крыс статистически значимы при p < 0,05.

При этом стимулирующий эффект ХГЧ на уровни стероидных гормонов при старении снижался в меньшей степени, чем при СД. В группе «Старение+ХГЧ» отмечено парадоксальное повышение уровня прогестерона, который превышал уровень этого гормона у контрольных крыс, как с обработкой ХГЧ, так и без таковой, в среднем в 2.5 раза. Кроме того, в группе «Старение+ХГЧ» был повышен уровень андростендиона, несмотря на снижение его прекурсора, 17-оксипрогестерона, и его продукта, Т (рис. 1). Причинами этого могут быть снижение активности цитохрома Р450 17А1, что вызывает накопление прогестерона, и ослабление активности 17β-гидроксист ероиддегидрогеназы, что приводит к нарушению конверсии андростендиона в Т.

Таким образом, нами показано снижение стимулирующего эффекта ХГЧ на продукцию половых стероидных гормонов у крыс с СД и стареющих животных, а также впервые выявлены изменения соотношений прекурсоров Т в семенниках, свидетельствующие о дифференцированном характере нарушений активности стероидогенных ферментов при СД и старении.

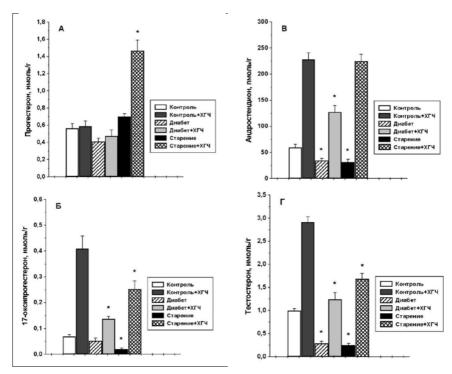


Рис. 1. Содержание прогестерона (A), 17-оксипрогестерона (Б), андростендиона (В) и тестостерона (Γ) в семенниках контрольных, диабетических и стареющих самцов крыс и влияние на них обработки ХГЧ.

 * — различия между группами контрольных крыс и соответствующими им группами диабетических и стареющих крыс статистически значимы при p<0,05.

Финансирование работы

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20122).

Список литературы

1. Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells in vitro/Riccetti L., De Pascali F., Gilioli L. et al. //Reproductive Biology and Endocrinology. -2017. - Vol. 15, No. 1. - P. 1-12.

- 2. Shpakov A.O., Derkach K.V., Bondareva V.M. Changes in hormone sensitivity of the adenylate cyclase signaling system in the testicular tissue of rats with neonatal streptozotocin-induced diabetes //Bulletin of experimental biology and medicine. -2009. Vol. 148, N0. 3. P. 394-398.
- 3. Decrease in the Basal and Luteinizing Hormone Receptor Agonist—Stimulated Testosterone Production in Aging Male Rats/ Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V et al. //Advances in Gerontology. -2019. Vol. 9. No. 2. P. 179-185.
- 4. Шпаков А.О. Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы при сахарном диабете //Проблемы эндокринологии. -2010. T. 56. №. 5. C. 23-29.
- 5. Niwas Jangir R., Chand Jain G. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review //Current diabetes reviews. -2014. Vol. 10, No. 3. -P. 147-157.
- 6. Effects of aging on the male reproductive system/ Gunes S., Hekim G. N. T., Arslan M. A., Asci R.//Journal of assisted reproduction and genetics. -2016. Vol. 33, N0. 4. P. 441-454.
- 7. Flück C.E., Pandey A.V. Steroidogenesis of the testis—new genes and pathways //Annales d'endocrinologie. 2014. Vol. 75, №. 2. P. 40-47.

УДК 615.03

Хакимова Р.А., Бекташев И.Б., Дилшодов А.Д.

Андижанский государственный медицинский институт, Андижан, Республика Узбекистан islomjonbektashev@gmail.com

Применение мумиё-асиль в терапии хронического туберкулеза легких

Использование мумие в комплексной схеме лечения больных с хроническим фиброзно-кавернозным туберкулезом с различными сопутствующими заболеваниями, в том числе и изменениях печени, даёт положительную клиническую, лабораторную и рентгенологическую динамику. Данный эффективный препарат можно рекомендовать для повторного использования в условиях амбулаторного лечение на фоне 3-4 противотуберкулезных препаратов.

Ключевые слова: мумие, химический препараты, схема лечение, мумиё-асиль.

Hakimova R.A., Bektashev I.B., Dilshodov A.D. Andijan State Medical Institute, Andijan, Repoblic of Uzbekistan

Application of mummy-asil in the treatment of chronic tuberculosis of the lungs

The use of mummy in a complex treatment regimen for patients with chronic fibrous-cavernous tuberculosis with various concomitant diseases, including liver changes, gives a positive clinical, laboratory and radiological dynamics. This effective drug can be recommended for re-use in outpatient treatment with 3-4 anti-tuberculosis drugs.

Key words: mummy, chemical preparations, treatment regimen.

Актуальность: в настоящее время в структуре больных туберкулезом наблюдается увеличение случаев тяжелых, распространенных деструктивных форм туберкулеза, в том числе фиброзно- кавернозного туберкулеза [5]. Именно данная форма туберкулеза играет главенствующую роль приводящей к смерти пациента. Причиной смерти больных с хроническим фиброзно- кавернозным и другими хроническими текущими видами туберкулеза является: прогрессирование процесса, а также различные осложнения [8]. Хронические формы туберкулеза в настоящее время характеризуются: увеличением различных сопутствующих заболеваний, так, например, у одного больного могут наблюдаться 2 и более заболевания, у таких пациентов часто наблюдается прогрессирование процесса вследствие плохой переносимости препаратов или формированием устойчивости к противотуберкулезным препаратам. В 60-70 годах прошлого столетия мумиёасиль широко применялся при лечении костно- суставного туберкулеза (профессор И. Сулейманов), причем получены обнадеживающие результаты.

Природное вещество — мумиё в корне отличается от химических лекарственных веществ, так как он содержит более восьмидесяти различных элементов, обеспечивающих положительное влияние на различные механизмы туберкулезного воспаления (рассасывание, уменьшение количества осумкованных очагов казеоза, улучшение репарации паренхимы легкого), что обуславливает эффективность его в терапии истощенного хроническим туберкулезом организму больного человека. Мумие является природным бальзамом, поскольку в его состав входят лечебные горные травы, такие как: арча, шипов-

ник, можжевельник, ревень, лишайники, пырей, мята, чабрец, валериана, полынь и другие, которые очень необходимы [2, 4, 6, 7, 9].

Состав мумие уникален и включает в себя большой арсенал органических и минеральных соединений, обеспечивающих противомикробное, иммуностимулирующее и противовоспалительное действие. Мумиё также отличается богатством содержанием различных, важных для функционирования организма элементов: железо, кальций, магний, калий, цинк, различные микро и макроэлементы, окиси металлов, аминокислоты и витамины, флавоноиды, каротиноиды, янтарная кислота и др., обеспечивают мумиё устранять отечность и восстанавливает силы организма после заболевания [1, 2, 3].

Сайты интернета заполнены рецептами применения мумиё асиль при легочном туберкулезе. Так, по мнению ряда целителей даже при самых тяжелых симптомах туберкулеза, мумиё способно оказать помощь в положительной динамике в течение заболевания. Однако официальных научных статей по лечению легочного туберкулеза мумиё нами не найдены.

Материалы и методы исследования. В разработку включены истории болезни 58 пациентов с хронически текущим фиброзно-кавернозным туберкулезом легких, получивших лечение в областном противотуберкулезном диспансере. Данные пациенты получали лечение противотуберкулезными препаратами по индивидуальной схеме с учетом лекарственной чувствительности и переносимости.

Результаты и их обсуждение. Длительность наблюдения в стационаре и амбулаторных условиях составил 3,5 года. Возраст больных включенных в разработку колебался от 23 до 54 лет, превалировали лица мужского пола в возрасте до 40 лет. Распространенность процесса в легких: у 20 больных ограничивался долей. Две доли и очаги отсева выявлены — у 13; двусторонние процессы у — 25. Единичные каверны средних размеров у – 23; множественные крупные каверны определялись – у 35. У всех пациентов установлено обильное бактериовыделение, с сохраненной чувствительностью к противотуберкулезным препаратам. Сопутствующие заболевания: гастриты – у 16, язва желудка и двенадцатиперстной кишки — у 10, хронические гепатиты, в том числе лекарственный токсический гепатит — у 29; легочно-сердечная недостаточность – 27. У некоторых пациентов имелось по несколько сопутствующих заболеваний. Клинические симптомы у пациентов: у всех 58 больных отмечался длительный кашель, с трудно отделяемой мокротой гнойного характера; усталость установлена у 35, одышка – у 26 пациентов, боли в груди у 24 пациентов, повышение температуры тела свыше 37,5°C – 38 больных; кровохарканье – у 16 пациентов, похудание -29.

Длительный кашель, у данных пациентов был связан как с тубер-кулезным процессом, так у 32 пациентов связан с курением (средний стаж курения — 8 лет, интенсивность курения — в среднем 15 сигарет в день).

Аускультативная картина: у 47 пациентов выслушивались различного тембра сухие хрипы, у 34 влажные (разнокалиберные, в основной массе незвучные); у 12 пациентов выслушивалось амфорическое дыхание (это пациенты, в легких у которых имелись гигантские каверны).

Показатели гемограммы: анемия средней степени выраженности у 27, тяжелая степень анемии у 15; лейкоциты — у 39 больных имелся лейкоцитоз порядка $9-10\times10^{9}$; палочкоядерный сдвиг влево — у 31; СОЭ увеличено у 41 пациента.

В индивидуальную противотуберкулезную терапию включены препараты, которые пациенты, хорошо переносили, чаще всего это была схема: изониазид+ пиразинамид + этамбутол или изониазид+ этамбутол+ стрептомицин. Через месяц или полтора месяца от начала лечения пациентам в комплексную схему лечения включался мумиёасиль (аптечный по 0,2-2 раза в день в течение месяца).

От момента начала приема мумие, проводилась динамическое наблюдение, включающее: клиническое наблюдение, лабораторное, рентгенологическое исследование.

Начиная со второй недели у 23 отмечено уменьшение интенсивности кашля и уменьшение количества отделяемой мокроты. К концу лечения мумие у 40 пациентов, мокрота носила уже слизистый характер, отделялась легко. Улучшилось самочувствие, несколько улучшился аппетит у 38 пациентов, нормализация температуры достигнуто у 25 пациентов. Динамика аускультативных симптомов: уменьшение количества сухих хрипов у 29; влажных хрипов у 26. Показатели гемограммы через 1 месяц лечения мумие-асиль — у 39 отмечено некоторое увеличение количества эритроцитов, положительные изменения лейкоформулы и снижение СОЭ было у 38 больных. Положительные изменения при рентгенологическом исследовании: некоторое рассасывание очагов обсеменения наблюдалось у 41 пациента, рассасывание инфильтративных теней — у 19, уменьшение размеров каверны — у 15.

Несмотря на проводимую комплексную терапию, 4 пациента умерли от прогрессирования легочно-сердечной недостаточности, вследствие прогрессирования процесса.

Выводы: у больных с хроническим фиброзно-кавернозным туберкулезом с различными сопутствующими заболеваниями, в том числе и изменеиях печени применение в комплексной схеме лечения му-

миё-асиль, даёт положительную клиническую, лабораторную и рентгенологическую динамику. И данный эффективный препарат можно рекомендовать для повторного использования в условиях амбулаторного лечение на фоне 3-4 противотуберкулезных препаратов.

Список литературы

- 1. Аминов С. Оригинальное мумиё или горные слезы// Халк табобати 2020, № 1 (2). С. 20—21.
- 2. Младенов Стоймир О без лекарственном лечении туберкулеза// София, 1996.
- 3. Мутие. Ru. Помогает ли мумие при лечении туберкулеза // Май $16,\,2015$
- 4. Неумывакин И.П. Лечение туберкулеза прополисом// М., $2014.21 \, c.$
- 5. Павлунин А.В. Кавернозный и фиброзно- кавернозный туберкулез легких: Современный взгляд на патогенез, диагностику и лечение// Современные технологии в медицине 2012, № 1 (115). С. 120-123.
- 6. Прополис. Применение при туберкулезе легких // из газеты «ВЕСТНИК ЗОЖ» 2015. 7 марта.
- 7. Ражабова Г.Х. Мумиё в медицине (Обзор литературы) //Электронный научный журнал «Биология и интегративная медицина» 2017.- №3.- с.131-143.
- 8. Сметанина Е.А., Сметанин А.Г., Стаханов В.А., Роменский В.В. Особенности рентгенологической характеристики клинических форм туберкулеза. Российский медицинский журнал. 2016; 22(4): 198—202.
- 9. Шакиров А.Ш.Тайна древнего бальзама мумиё-асиль // Таш-кент.- 1973.- С. 30.

УДК 616.24-036.12:575.174

Хотько Е.А., Харлап А.Ю.

Белорусский государственный медицинский университет Минск qwert.poilk@mail.ru

Ассоциация полиморфизмов генов IL10, IL4 и IL4R с предрасположенностью к хронической обструктивной болезни легких в белорусской популяции

Прогнозирование риска возникновения хронической обструктивной болезни легких представляет определенные трудности, поскольку на сегодняшний день однозначно не определены универсальные маркеры. В ста-

тье рассмотрены полиморфизмы генов IL10 (rs1800896), IL4 (rs2243250) и IL4R (rs1801275) в качестве возможных генетических маркеров для оценки риска развития заболевания.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, полиморфизм, риск.

Khotko C.A., Harlap A. Yu. Belarusian State Medical University, Minsk

Association of IL10, IL4 and IL4R gene polymorphisms with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in the Belarusian population

Risk prediction of chronic obstructive pulmonary disease has certain difficulties, since currently there is not identify universal markers. The article discusses the rs1800896 polymorphism of IL10 (rs1800896), IL4 (rs2243250) and IL4R (rs1801275) genes as possible genetic markers to assess the risk of disease development.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, polymorphism, risk.

Актуальность. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой серьезную проблему здравоохранения в мире, поскольку характеризуется как ростом заболеваемости, так и смертности во всех промышленно развитых странах [1]. На сегодняшний день курение признано ведущим фактором риска в этиопатогенезе ХОБЛ. Тем не менее, только у 10–20% всех заядлых курильщиков развивается ХОБЛ [1]. Другие факторы окружающей среды незначительны по сравнению с курением, но они подтверждают мнение о том, что ХОБЛ является многофакторной патологией. Так, проведенные близнецовые и семейные исследования доказывают, что генетическая предрасположенность также играет важную роль в развитии ХОБЛ [1]. На сегодняшний день наиболее распространенным подходом в поиске потенциально важных генетических факторов риска заболеваний является анализ генов-кандидатов. В первую очередь к ним относятся гены тех белковых молекул, которые принимают активное участие в патогенезе заболевания.

ХОБЛ характеризуется, прежде всего хроническим воспалительным процессом в легких, который плохо поддается лечению. Некоторые цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин-4 (IL4), IL8 и IL10, а также их рецепторы, расположенные на мембране клеток, принимают непосредственное участие в формировании воспалительного процесса [1].

Было установлено, что более высокий уровень упомянутых белков обусловлен изменением транскрипции соответствующих генов вследствие их полиморфизма в области промоторов, в то время как качественные изменения структуры белков связаны с наличием полиморфных вариантов в экзонах [1]. Таким образом, полиморфизм генов цитокиновых молекул и их рецепторов может представлять интерес для оценки предрасположенности к воспалительным заболеваниям.

Показано, что полиморфизмы в гене IL10 связаны с тяжелым риновирусным бронхиолитом, постбронхиолитной астмой и снижением функции легких [2]. Сообщается, что идентификация полиморфных локусов гена IL10, как потенциального гена-модификатора предрасположенности к XOБЛ, является важной для пациентов, имеющих дефицит α_1 -антитрипсина [2]. Также отмечено, что полиморфизмы rs2243250 гена IL4 и rs1801275 гена IL4R связаны со снижением функциональной активности легких при бронхиальной астме, туберкулезе и раке легкого [3, 4]. Однако оценка ассоциации полиморфных локусов rs2243250 и rs1801275 с развитием XOБЛ до настоящего момента не проводилась.

В связи с этим целью настоящего исследования явился анализ распределения частот генотипов полиморфных локусов rs1800896 гена IL10, rs2243250 гена IL4 и rs1801275 гена IL4R у пациентов с ХОБЛ и последующая оценка риска развития заболевания при носительстве того или иного генотипа соответствующих полиморфных локусов.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 190 человек европеоидной расы, включая пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц, которые постоянно проживают на территории Республики Беларусь. На базе учреждения здравоохранения «Минский клинический консультативно-диагностический центр» пациентам с ХОБЛ в период с 2016 по 2018 гг. было проведено инструментальное исследование функции внешнего дыхания. В дальнейшем в исследуемую группу были отобраны только те лица, которые правильно выполнили дыхательный маневр при тестировании функции внешнего дыхания и не имели в анамнезе бронхиальной астмы, туберкулеза легких или других патологий бронхолегочной системы. В результате в группу исследования были включены 80 мужчин и 15 женщин, средний возраст которых составил 64,1 года. При этом 64,8% обследуемых были постоянными курильщиками. Пациенты классифицировались как нынешние или бывшие курильщики, если в анамнезе было указано, что индекс курения составил не менее 10 пачек/лет.

В контрольную группу вошли 95 здоровых добровольцев, у которых в ходе спирометрии отмечены уровень $O\Phi B_1$ не менее 80% и величина отношения $O\Phi B_1/\Phi$ ЖЕЛ не менее 70%. Среди лиц, вошедших в группу популяционного контроля, было включено 74 человека мужского пола и 21 пациента женского пола. Средний возраст обследуемых составил 53,1 года. Из исследования были исключены пациенты, имеющие симптомы заболеваний бронхолегочной системы или указания на наличие легочной патологии в анамнезе. Среди обследуемых контрольной группы 62% были постоянными или бывшими курильщиками с индексом курения свыше 10 пачек/лет.

Для проведения молекулярно-генетического исследования были выбраны полиморфные локусы генов IL4, IL10 и IL4R. Полиморфизм rs1800896 (-1082T/C) гена IL-10 характеризуется заменой тимина на цитозин в проксимальной области промотора. Минорная аллель данного полиморфного локуса связана с повышенной функциональной активностью легких [1]. Полиморфизм IL4R rs1801275 приводит к замене глутамина на аргинин в 551 положении цитоплазматического домена зрелого рецептора [3]. Полиморфный локус rs2243250 гена IL-4 усиливает связывание ядерных факторов транскрипции с промоторной областью гена. В результате увеличивается синтез цитокина [4].

У всех обследуемых была отобрана кровь, из лимфоцитов которой выделена ДНК с помощью набора NucleoSpin Blood (MACHERY-NAGEL, Германия) согласно методике производителя. Типирование аллельного варианта проводили с помощью ТаqМап-зондов, используя полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (детектирующий амплификатор BioRad CFX96, «Bio-Rad Laboratories», США). В соответствии с протоколом BioRad CFX96 определяли конечную флуоресценцию и последующую дискриминацию по генотипу.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Office Excel и SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, версия 23.0). Для проверки соответствия эмпирического распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесию Харди—Вайнберга использовали критерий χ^2 Пирсона. Для качественных данных определяли частоты встречаемости в процентах (%). Сравнение номинальных данных проводили путем построения таблиц сопряженности, с последующим вычислением χ^2 . Ассоциацию генотипов с риском развития ХОБЛ оценивали на основании показателя отношения шансов (ОШ) и соответствующего доверительного интервала (95%ДИ).

Результаты. До того, как полиморфизмы генов-кандидатов были проанализированы на предмет ассоциаций с ХОБЛ, мы проверили, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга (HWE) как в группе пациентов, так и в группе здоровых лиц (табл. 1).

Таблица 1. Распределение генотипов в группе пациентов с ХОБЛ (тест Харди—Вайнберга)

Полимор- физм гена/ генотип	Равновес	ие для «опыт	Равновесие для «контрольной» группы					
	Пациенты с ХОБЛ, %	HWE, %	χ²	p	Здоровые лица, %	HWE, %	χ ²	р
IL4R, rs1801275								
A/A	31,6	38,3	9,87	<0,05	16,8	30,3	2,09	0,15
A/G	62,1	47,2			79,0	49,5		
G/G	6,3	14,5			4,2	20,3		
IL4, rs2243250								
C/C	64,2	61,5	2,61	0,11	58,9	60,6	0,98	0,32
C/T	28,4	33,9			37,9	34,5		
T/T	7,4	4,7			3,2	4,9		
IL10, rs1800896								
T/T	36,8	26,6			22,1	15,7		
T/C	29,5	50,0	16,76	<0,05	36,6	49,4	6,99	<0,05
C/C	33,7	23,5			45,3	38,9		

Наблюдаемые частоты генотипов полиморфного локуса rs1800896 гена IL10 у здоровых лиц (χ 2=6,99; p<0,05 и пациентов с ХОБЛ (χ 2=16,76; p<0,05) не были сопоставимы с их ожидаемыми частотами в соответствии с равновесием Харди—Вайнберга. Таким образом сформированные выборки были определены как нерепрезентативные, и полиморфизм гена IL10 из дальнейшего анализа был исключен.

Дальнейшее исследование частот распределения генотипов показало, что гомозиготное носительство генотипа, содержащего аллель А, гена IL4R встречается в контрольной группе в 16.8% случаев, а в группе пациентов с XOBJ - в 31.6% случаев ($\chi^2 = 7.09$, p = 0.008) (табл. 2).

Таблица 2. Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфизмов генов в группе пациентов с XOБЛ и здоровых лиц

Носительство генотипов	Пациенты с ХОБЛ, п (%)	Здоровые лица, п (%)	χ²	p	ОШ	95% ДИ
IL4R, rs1801275						
A/A	30 (31,6)	16 (16,8)		0,038	2,28	1,14-4,53
A/G	59 (62,1)	75 (79,0)	6,57		0,44	0,23-0,83
G/G	6 (6,3)	4 (4,2)			1,53	0,42-5,62
IL4, rs2243250						
C/C	61 (64,2)	56 (58,9)		0,213	1,25	0,67-2,24
C/T	27 (28,4)	36 (37,9)	3,09		0,65	0,35-1,20
T/T	7 (7,4)	3 (3,2)			2,44	0,61-9,73

Результаты оценки частот распределения генотипов полиморфизма rs2243250 не выявил статистически значимых различий (p=0,213) гомо- и гетерозиготного носительства по сравнению со здоровыми лицами.

Помимо изучения частоты полиморфизмов генов, была также проведена оценка риска возникновения ХОБЛ в зависимости от наличия мутации указанного гена. Для количественной оценки вероятности исследуемого события рассчитывали показатель отношения шансов (ОШ) и 95% доверительный интервал (95% ДИ). Рассчитанное ОШ для оценки риска носительства генотипов полиморфного локуса rs1801275 гена IL4R составило 2,28 при наличии гомозиготного генотипа А/А (95%ДИ=1,14—4,53) и 0,44 при наличии гетерозиготного генотипа А/G (95%ДИ=0,23—0,83) (таблица 3). Это свидетельствует о повышенном риске развития ХОБЛ у носителей генотипа с аллелью А в 2,28, а также о снижении вероятности возникновения ХОБЛ у гетерозиготных носителей в 2,27 раза.

Согласно результатам проведенного нами исследования у пациентов с ХОБЛ, жителей Республики Беларусь, имеет место повышенная частота встречаемости генотипа A/A полиморфного локуса rs1801275

гена IL4R. Представленные в работе данные указывают на необходимость генетического типирования полиморфного локуса rs1801275 гена IL4R с целью определения групп риска развития ХОБЛ среди пациентов, имеющих начальные клинические признаки заболевания.

Список литературы

- 1. He J-Q. et al. Polymorphisms of interleukin-10 and its receptor and lung function in COPD // Eur. Respir. J. -2007. No. 29. P. 1120-1126. doi: 10.1183/09031936.00002907
- 2. Dawn L. DeMeo. et al. IL10 Polymorphisms are associated with airflow obstruction in severe a1-antitrypsin deficiency // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. -2008. № 38. P. 114-120. doi: 10.1165/rcmb.2007-0107OC
- 3. Juan M. Reséndiz-Hernández. et al. Genetic polymorphisms and their involvement in the regulation of the inflammatory response in asthma and COPD // Adv. Clin. Exp. Med. -2018. No 27(1). P. 125-133. doi: 10.17219/acem/65691
- 4. William Murk et al. Attempted replication of 50 reported asthma risk genes identifies a SNP in RAD50 as associated with childhood atopic asthma // Hum. Hered. -2011. -N 71. -P. 97-105. doi: 10.1159/000319536

УДК 577.22+577.27

Хрусталёв В.В.¹, Хрусталёва Т.А.², Арутюнян А.М.³, Кордюкова Л.В.³, Побойнев В.В.¹

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹, Минск

ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»², Минск НИИ Физико-химической биологии МГУ³, Москва vvkhrustalev@mail.ru, tanissia.lir@gmail.com, alarut@belozersky.msu.ru, kord@belozersky.msu.ru, dremozzew@mail.ru

Олигомеры аттенуированного прионного пептида СС36 диссоциируют при нагревании: спектроскопическое исследование

Проведён анализ зависимости интенсивности спектра кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете пептида ССЗ6, соответствующего остаткам 179—214 большого прионного белка человека, от температуры. Сделан вывод о возможности олигомеров пептида ССЗ6 к диссоциации при нагревании и о снижении его амилоидогенных способностей за счёт четырёх аттенуирующих аминокислотных замен.

Ключевые слова: прион, круговой дихроизм, триптофан.

Khrustalev V.V.¹, Khrustaleva T.A.², Arutyunyan A.M.³, Kordyukova L.V.³, Poboinev V.V.¹

Belarusian State Medical University¹, Minsk Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus², Minsk A N Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology³, Moscow

Oligomers of attenuated CC36 prion peptide dissociate upon heating: a spectroscopic study

In this work the dependence on temperature of the intensity of circular dichroism signal in close ultraviolet of prion peptide CC36, corresponding to residues 179 – 214 of the major prion protein, has been analyzed. According to the obtained results, oligomers of CC36 peptide are proposed to dissociate upon heating, that should be an indication of the decrease of its amyloidogenic properties due to the four attenuating amino acid replacements.

Key words: prion, circular dichroism, tryptophan.

Введение. Прионные болезни, наряду со многими другими, относятся к заболеваниям, в основе патогенеза которых лежит приобретение определённым белком неправильной конформации [1]. Причиной развития наследственных прионных болезней являются мутации в гене, кодирующем прионный белок человека, способствующие его переходу из преимущественно альфа-спирального в преимущественно бета-структурное состояние [2]. По одной из теорий мономеры бета-структурного прионного белка способны связываться с альфаспиральным прионным белком и вызывать в последнем альфа-бета переход с образованием межмолекулярной бета-структуры [3]. В результате неоднократного повторения этого процесса образуется бета-амилоид, состоящий из множества связанных друг с другом межмолекулярной бета-структурой молекул белка. Помимо наследственных, известны инфекционные прионные болезни. Так, нормальный прионный белок крупного рогатого скота, перешедший в преимущественно бета-структурное состояние, способен заражать человека при употреблении говядины, не прошедшей должной термической обработки. Известны случаи заражения человека при лечении гормоном роста и пересадке твёрдой мозговой оболочки [2]. Течение болезни длительное, медленно прогрессирующее и необратимое.

При разработке вакцины против прионных болезней необходимо не только сконструировать антиген, содержащий бета-структуру, соответствующую таковой в прионном белке, но и лишить этот антиген способности вызывать альфа-бета переход у нормального прионного белка.

Ранее нами был синтезирован пептид СС36 [4], основанный на фрагменте большого прионного белка человека NH₂-CVNITIKQHTV TTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMC-COOH (Cys179-Cys214 в нумерации полноразмерного белка), наиболее подверженному альфабета переходу согласно данным биоинформатических исследований [5]. В пептид были введены четыре аминокислотные замены (V2P, F20W, M28R, V32R). Одна из них — F20W — была сделана для появления в составе пептида флюорофора — остатка триптофана. Функция остальных трёх замен заключалась в снижении амилоидогенного потенциала пептида [4].

Так, вместо M28 и V32 в последовательность пептида были включены остатки аргинина [4]. В получившемся мотиве «RERVRE» остатки аргинина должны препятствовать образованию бета-тяжа, находясь в положениях «1-3» друг от друга, и способствовать формированию альфа-спирали, находясь в положениях «1-4» с остатками глутаминовой кислоты.

С целью сокращения длины бета-тяжа в районе N-конца пептида вместо остатка V2 был введён пролин — разрушитель бета-структуры [4]. Действительно, если до замены алгоритм FoldAmyloid (http://bioinfo.protres.ru/fold-amyloid/) на N-конце пептида предсказывает амилоидогенный фрагмент длиною в шесть аминокислотных остатков, то после замены V2P амилоидогенный потенциал данного фрагмента пептида полностью исчезает.

Интересно отметить, что попытка возвращения в последовательность F20 и добавления остатка триптофана к N-концу цепи сопровождалась возникновением непреодолимых трудностей в процессе твёрдофазного синтеза пептида за счёт формирования бета-структуры растущими цепями [6]. Действительно, остаток F обладает более высоким бета-структурным потенциалом, чем остаток W: вероятности формирования бета-структуры по аминокислотной шкале алгоритма PentaFold 2.0 данными аминокислотами равны 0,435 и 0,399, соответственно [7].

Остатки триптофана интересны тем, что способны давать спектр кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете в случае формирования контактов с другими аминокислотными остатками в белке [8]. Уменьшение интенсивности спектра кругового дихроизма в области 260-280 нм при повышении температуры свидетельствует о разрушении контактов между остатками триптофана и соседними с ними аминокислотными остатками. Такой процесс в случае с относительно коротким прионным пептидом должен указывать на способность олигомеров пептида к диссоциации, что не характерно для амилоида [1].

Целью работы явился анализ спектра кругового дихроизма пептида CC36 в водном растворе по мере нагревания.

Материалы и методы исследования. Синтетический пептид СС36 имеет молекулярную массу 4266 Да, степень его очистки — 96,63% (производитель — Peptide 2.0). В работе использовался пептид СС36 без дисульфидной связи между первым и последним остатками.

Спектр кругового дихроизма раствора пептида СС36 (246 мкг/мл) в 0,01М фосфатном буфере с рН=5,3 снимали с помощью спектрографа Chirascan в ближнем ультрафиолете: от 240 до 340 нм. При этом использовали кювету с длиной оптического пути 1 см. Скорость нагревания раствора составляла 1 градус в минуту. Первый спектр снимали при температуре 5°С, далее — с шагом в 5 градусов — до 80°С. Каждый спектр обрабатывали с помощью программы Pro-Data Viewer путём сглаживания методом Савицкого-Галлея [9]. Площадь под кривой КД определяли геометрически от 257 до 295 нм. Далее строили график зависимости последней от температуры.

Результаты и их обсуждение. Тот факт, что на спектре кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете (при 260 — 290 нм) пептида СС36 в водном растворе присутствует пик (рис. 1), говорит о формировании разнообразных контактов остатком триптофана с другими аминокислотными остатками.

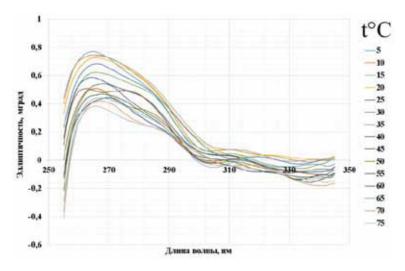


Рис. 1. Спектры кругового дихроизма пептида СС36 без дисульфидной связи в ближнем ультрафиолете по мере нагревания

При температуре от 5 до 20°C форма и интенсивность пика остаются постоянными. При дальнейшем росте температуры (рис. 2) площадь под кривой этого пика (от 257 до 295 нм) снижается резко и линейно (от 20 до 55°C), а затем более плавно (от 55°C до 75°C). Судя по данным, приведенным на рисунке 2, количество контактов с другими остатками в целом для единственного триптофана в пептиде СС36 снижается при нагревании, что свидетельствует о диссоциации его олигомеров. Последняя протекает, как минимум, в два этапа: диссоциация олигомеров определённого порядка происходит полностью при температурах от 20 до 55°C, а затем постепенно диссоциируют олигомеры более низкого порядка.

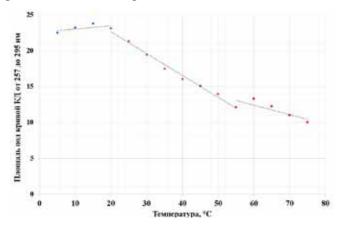


Рис. 2. Зависимость площади под кривой спектра кругового дихроизма пептида CC36 в ближнем ультрафиолете (от 257 до 295 нм) от температуры

Данные по температурному тушению флюоресценции триптофана [4] в пептиде в целом согласуются с таковыми по круговому дихроизму в ближнем ультрафиолете [4]. Спектр кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете практически не изменяется по мере нагревания пептида СС36, что свидетельствует о том, что вторичная структура его остаётся неизменной [4]. Сама по себе вторичная структура пептида включает как короткий альфа-спиральный фрагмент (10-13%), так и бета-структуру (18-35%) [4]. Судя по полученным данным, пептиды в олигомерах располагаются в положении «голова к хвосту», не образуя при этом межмолекулярную бета-структуру, что подтверждают и результаты белок-белкового докинга, ранее проведённого нами [4] с помощью программы (4)

В олигомерах остаток триптофана, находящийся на «вершине» пептида — в петле между бета-тяжами — будет расположен рядом с дисульфидной связью, С-концевой карбоксильной группой и остатком Glu33 соседнего пептида [4]. При диссоциации таких олигомеров остаток триптофана будет лишаться контактов с соседними остатками, что будет приводить как к повышению интенсивности его флюоресценции, так и к сокращению площади под кривой кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете [8].

Выводы. Данные о динамике снижения интенсивности сигнала кругового дихроизма от остатка триптофана в составе аттенуированного прионного пептида СС36 в водном растворе по мере нагревания свидетельствуют о способности олигомеров этого пептида к диссоциации. Согласно полученным данным, эти олигомеры не представляют собой амилоид, а аттенуированный пептид СС36 может использоваться в дальнейших экспериментах по созданию вакцины против прионных болезней.

Список литературы

- 1. Avila-Vazquez M.F., Altamirano-Bustamante N.F., Altamirano-Bustamante M.M. Amyloid biomarkers in conformational diseases at face value: a systematic review // Molecules. 2017. Vol. 23. N. 79.
- 2. Knight R. Infectious and sporadic prion diseases // Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2017. Vol. 150. P. 293 318.
- 3. Groveman B.R., Dolan M.A., Taubner L.M., Kraus A., Wickner R.B., Caughey B. Parallel in-register intermolecular β -sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids // Journal of Biological Chemistry. 2014. Vol. 289. P. 24129 24134.
- 4. Khrustalev V.V., Khrustaleva T. A., Szpotkowski K., Poboinev V.V., Kakhanouskaya K.Y. The part of a long beta hairpin from the scrapie form of the human prion protein is reconstructed in the synthetic CC36 protein // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2016. Vol. 84. P. 1462 1479.
- 5. Adrover M., Pauwels K., Prigent S., de Chiara C., Xu Z., Chapuis C., Pastore A., Rezaei H. Prion fibrillization is mediated by a native structural element that comprises helices H2 and H3 // Journal of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285. P. 21004 21012.
- 6. Хрусталёва Т.А., Хрусталёв В.В., Побойнев В.В. Амилоидогенный потенциал аминокислотных замен в прионном пептиде СС36 // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии: сборник материалов III Конференции молодых учёных биохимиков и мо-

лекулярных биологов с международным участием. Гродно, «ЮрСа-Принт», 2017. С. 130-133.

- 7. Khrustalev V.V., Khrustaleva T.A., Poboinev V.V. Amino acid content of beta strands and alpha helices depends on their flanking secondary structure elements // Biosystems. 2018. Vol. 168. P. 45 54.
- 8. Rogers D.M., Hirst J.D. First-principles calculations of protein circular dichroism in the near ultraviolet // Biochemistry. 2004. Vol. 43. P. 11092 11102.
- 9. Savitzky A., Golay M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures // Analytical Chemistry. 1964. 36. 1627–1639.
- 10. Ghoorah W.A., Smail-Tabbone M., Devignes M.-D., Ritchie D.W. Protein docking using case-based reasoning // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2013. Vol. 81. P. 2150 2158.

УДК 616

Шлейкин А.Г.¹, Бландов А.Н.², Кружляк Петер (Kruzliak Peter)³, Муста Оглы Н.М.⁴ Частное образовательное учреждение высшего образования^{1,2} «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург, Россия Масарикский университет³, Брно, Республика Чехия Университет ИТМО⁴, Санкт-Петербург, Россия shleikin@yandex.ru¹, blandov.2015@yandex.ru², kruzliakpeter@gmail.com³, nargul m@mail.ru⁴

Биологически активные вещества растений как потенциальные антагонисты канцерогенов и их роль в химиопрофилактике рака

Экспериментальные данные подтверждают защитные эффекты природных биологически активных веществ (БАВ) растений против воздействия канцерогенов. Обосновывается введение растительных антиоксидантов в рацион питания для защиты от канцерогенов.

Ключевые слова: канцерогены, пищевые БАВ растений, антиоксидантs, химиопрофилактика

Shleikin A.G.¹, Blandov A.N.², Kruzliak P.³, Musta Ogly N.M.⁴
Private Higher Education Institution «St. Petersburg Medical
and Social Institute»^{1,2},
Masaryk University³, Brno, Czech Republic,
ITMO University⁴, St. Petersburg, Russia

Plant biologically active substances as potential antagonists of carcinogens and their role in cancer chemoprophylaxis

Experimental data confirm the protective effects of natural biologically active substances (BAS) of plants against the effects of carcinogens. The introduction of plant antioxidants into the diet to protect against carcinogens is substantiated. **Key words:** carcinogens, food plant BAS, antioxidants, chemoprophylaxis.

Такие факторы образа жизни, как режим питания или курение, увеличивают действие химических канцерогенов на человека [1]. Основным источником гетероциклических ароматических аминов (ГАА), активирующих канцерогенез, является белковая пища, приготовленная при высоких температурах. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и нитрозамины в основном генерируются при использовании табачных изделий [2]. Несмотря на воздействия вредных веществ окружающей среды, пища, богатая фруктами и овощами, является хорошим источником профилактических биологически активных веществ (БАВ). Они действуют посредством различных механизмов, в том числе благодаря антиоксидантной и детоксицирующей активности. Кроме того, БАВ растений модулируют пролиферативные и апоптотические пути раковых клеток и играют роль регуляторов эпигенетических механизмов, что также имеют значение для химиопрофилактики рака [3]. БАВ растений определяются как вторичные метаболиты непитательных веществ растений, присутствующие во фруктах, овощах или зернах и способные снизить риск различных заболеваний [4]. Терпеноиды, алкалоиды, изотиоцианаты и полифенолы считаются наиболее изученными БАВ, связанными с окислительным повреждением. В частности, БАВ растений проявляют большую антиоксидантную активность по поглощению радикалов [5], предотвращают повреждение ДНК и, следовательно, препятствуют возникновению рака. Защитная роль БАВ растений против окислительного стресса, вызванного канцерогеном, оценивается с использованием 8-оксодезоксигуанозина (8-оксо-dG) или нитротирозина в качестве маркеров окислительного повреждения ДНК и нитрозного стресса [6]. БАВ растений также способствуют детоксикации и усилению выведения экзогенных или эндогенных канцерогенов [7] путем ингибирования ферментов фазы I, активирующих канцерогены, или индукции ферментов фазы II, таких как глутатион-S-трансфераза (Г-S-T) или уридиндифосфат-глюкуронилтрансфераза (УГТ) [20], которая превращает канцерогены в более легко экскретируемые формы [8]. БАВ растений могут инициировать защитные

эпигенетические механизмы, при этом питание развивающегося организма приобретает особое значение [3].

В нескольких исследованиях была проанализирована защитная роль природных антиоксидантов против образования ГАА, в частности 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-b]пиридина (PhIP) при приготовлении пищи. Экстракт чая Rosa rugosa (RTE – Rosa rugosa Tea Extract) является известным источником фенольных соединений, обладающих способностью способностью ингибировать образование свободных радикалов. Фактически, RTE ингибировал образование ГАА в мясных котлетах при различной температуре. Интересно, что количество общих ГАА в котлетах из говяжьего фарша, обжаренных при 160 °C, уменьшилось на 75% и на 46% при 220 °C. Аналогичным образом было продемонстрировано, что экстракт боярышника в концентрациях 0,5% и 1% может снизить образование ГАА в говядине и курином мясе, приготовленных при высокой температуре [12]. Сычуаньский перец, широко используемый в кулинарии и в качестве растительного лекарственного средства в азиатских культурах, и экстракт сансамида также ингибировали образование ГАА в жареных котлетах из говяжьего фарша. В концентрации 0,005% [16]. Экстракт семян граната также ингибировал образование PhIP на 68% в мясных фрикадельках из говядины и на 75% в куриных фрикадельках, причем эти результаты зависят от способа приготовления [10]. Обогащенный полифенолами высушенный экстракт яблочной кожуры (ВЭЯК) ингибировал образование ГАА, включая PhIP, в жареных котлетах из говядины [11]. Действие природных веществ на повреждение, вызванное PhIP, было продемонстрировано и в доклинических исследованиях. В частности, куркумин ингибировал образование PhIPиндуцированных аддуктов ДНК и двойных разрывов ДНК и уменьшал выработку АФК в нормальных эпителиальных клетках молочной железы [15]. δ- и γ-токоферолы также снижали образование опухолей толстой кишки, подавляли окислительные и нитрозные маркеры и провоспалительные медиаторы и, следовательно, защищали от раннего повреждения клеток и ДНК при PhIP-индуцированном канцерогенезе в толстой кишке [6]. Сульфорафан и кверцетин снижали уровень аддуктов PhIP-ДНК дозозависимым образом и, таким образом, увеличивали скорость детоксикации PhIP в интактных человеческих клетках НерG2, однако они не оказывали влияния на скорость восстановления аддукта PhIP-ДНК [9]. Fucceli и соавторы [13] оценивали профилактическую эффективность фенольных экстрактов из оливкового масла и оливковых листьев в отношении генотоксичности, вызванной гетероциклическими аминами, включая PhIP, в свежеизолированных мононуклеарных клетках периферической крови человека. В этом опыте повреждения ДНК предотвращались всеми фенольными экстрактами в очень низких концентрациях, которые могут быть достигнуты в тканях человека при регулярном употреблении оливкового масла [13].

Антиинициирующую эффективность сульфорафана против индуцированного бензо(а)пиреном (В[а]Р) канцерогенеза легких оценивали в этой модели in vivo. Сульфорафан уменьшал вызванный канцерогеном стресс посредством ингибирования В[а]Р-индуцированной активации АуР [14]. Кроме того, было показано, что куркумин нейтрализует гистопатологические отклонения, вызванные приемом В[а]Р, в тканях легкого. Антиоксидантную и противоопухолевую эффективность пищевого флавона лютеолина оценивали при В[а] P-индуцированном канцерогенезе легких у мышей альбиносов Swiss. Пероральное введение В[а]Р увеличивало специфические опухолевые маркеры в легких и снижало уровни ферментативных и неферментативных антиоксидантов. Введение лютеолина (15 мг/кг массы тела, перорально) противодействовало всем этим изменениям и поддерживало нормальное состояние клеток. В-каротин и ретинол также снижают В[а]Р-индуцированную мутагенность и окислительный стресс посредством модуляции ферментов, метаболизирующих ксенобиотики, в клеточной линии HepG2. Эффективность галангина, пищевого флавонола, в ингибировании инициации опухоли оценивали при экспериментальном онкогенезе легких, индуцированном В[а]Р, у самцов мышей-альбиносов Swiss. У животных, индуцированных В[а]Р, введение галангина (20 мг/кг массы тела) противодействовало патологическим процессам и восстанавливало клеточный гомеостаз [17]. Было обнаружено, что полимерные полифенолы черного чая влияют В[а]Р и ННК-индуцированный канцерогенез легких у мышей-альбиносов. Было продемонстрировано, что ингибирование развития рака за счет полифенолов черного чая опосредуется через снижение пролиферации клеток и увеличение апоптоза. Кроме того, потребление изотиоцинатов тесно связано с химиопрофилактической эффективностью рака. Было показано, что 2-фенетилизотиоцианат (PEITC), который содержится в кресс-салате и других крестоцветных овощах [18], модулирует биотрансформацию ферментов, необходимых для метаболизма канцерогенов. Определение уровней мРНК и апопротеина СҮР1А1 в срезах печени крысы, обработанных В[а]Р, выявило способность PEITC и силимарина ингибировать биоактивацию указанного пути канцерогена [19]. Детоксикационные эффекты полисахарида алоэ (APS) и прополиса на экскрецию с мочой табачных канцерогенов B[a] P и котинина, метаболита никотина, были исследованы у курильщиков. По сравнению с контрольной группой наблюдалось увеличение уровня выведения B[a]P и котинина в моче в зависимости от времени после добавления смеси APS и прополиса. Таким образом, снижается риск развития рака или других заболеваний [20].

Защитная эффективность флавоноидной фракции яблочной кожуры (AF4), богатой флавоноидами и фенольными кислотами, такими как кверцетин гликозиды, эпикатехин, цианидин-3галактозид, хлорогеновая кислота и флоридзин, против повреждения ДНК, вызванного различными канцерогенными химическими агентами, была показана в нормальных бронхиальных клетках человека (BEAS-2B). Повреждение ДНК было индуцировано различными канцерогенными производными никотина. В результате было установлено, что AF4 защищает клетки от окислительного повреждения ДНК и облегчает репарацию ДНК [5]. Учитывая ингибирующее действие РЕІТС на активацию и канцерогенность нитрозаминов в легких на моделях грызунов, Yuan и соавторы [18] провели клиническое испытание на курильщиках. Исследование показало, что РЕІТС является потенциальным ингибитором канцерогенеза у курильщиков [18], а также тормозит опосредованную Р-450 биоактивацию нитроззаминов и индуцирует ферменты детоксикации [21]. Значительное число исследований посвящено факторам образования и детоксикации канцерогенных аминов в продуктах животного происхождения [22-26]. Изыскиваются и изучаются новые антиканцерогенные природные соединения. К их числу относится содержащаяся в растительных маслах дигомо-гамма-линоленовая кислота, способная ускорять ферроптоз в раковых клетках. Рассмотренные в обзоре работы обосновывают включение БАВ растений в рашион человека.

Список литературы

- 1. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. Semin Cancer Biol. 2004;14:473–86.
- 2. Powell JB, Ghotbaddini M. Cancer-promoting and inhibiting effects of dietary compounds: role of the Aryl hydrocarbon receptor (AhR). Biochem Pharmacol (Los Angel). 2014;3:1.
- 3. Guo Y, Su Z-Y, Kong AN. Current perspectives on epigenetic modifications by dietary chemopreventive and herbal phyto-chemicals. Curr Pharmacol Rep. 2015;1:245–57.

- 4. Abotaleb M, Samuel SM, Varghese E, et al. Flavonoids in cancer and apoptosis. Cancers. 2019;11:28.
- 5. George VC, Rupasinghe HPV. Apple flavonoids suppress carcinogen-induced DNA damage in normal human bronchial epithelial cells. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:1767198.
- 6. Chen JX, Liu A, Lee MJ, et al. δ and γ -tocopherols inhibit phIP/DSS-induced colon carcinogenesis by protection against early cellular and DNA damages. Mol Carcinog. 2017;56:172–83.
- 7. Baer-Dubowska W, Szaefer H. Modulation of carcinogenmetabolizing cytochromes P450 by phytochemicals in humans. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013;9:927–41.
- 8. James D, Devaraj S, Bellur P, Lakkanna S, Vicini J, Boddupalli S. Novel concepts of broccoli sulforaphanes and disease: induction of phase Ii antioxidant and detoxification enzymes by enhanced-glucoraphanin broccoli. Nutr Rev. 2012;70:654–65.
 - 9. Bacon JR, Williamson G, Garner RC, Lappin G, Langouët S, Bao
- 10. Hoffman JB, Petriello MC, Hennig B. Impact of nutrition on pollutant toxicity: an update with new insights into epigenetic regulation. Rev Environ Health. 2017;32:65–72.
- 11. Keşkekoğlu H, Uren A. Inhibitory effects of pomegranate seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef and chicken meatballs after cooking by four different methods. Meat Sci. 2014:96:1446–51.
- 12. Sabally K, Sleno L, Jauffrit JA, Iskandar MM, Kubow S. Inhibitory effects of apple peel polyphenol extract on the formation of heterocyclic amines in pan fried beef patties. Meat Sci. 2016;117:57–62.
- 13. Tengilimoglu-Metin MM, Hamzalioglu A, Gokmen V, Kizil M. Inhibitory effect of hawthorn extract on heterocyclic aromatic amine formation in beef and chicken breast meat. Food Res Int Ott Ont. 2017;99:586–95.
- 14. Fuccelli R, Rosignoli P, Servili M, Veneziani G, Taticchi A, Fabiani R. Genotoxicity of heterocyclic amines (HCAs) on freshly isolated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and prevention by phenolic extracts derived from olive, olive oil and olive leaves. Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc. 2018;122:234–41.
- 15. Narayanapillai SC, Lin SH, Leitzman P, Upadhyaya P, Baglole CJ, Xing C. Dihydromethysticin (DHM) blocks tobacco carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)- Induced O6-methylguanine in a manner independent of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway in C57BL/6 female mice. Chem Res Toxicol. 2016;29:1828–34.

- 16. Szterk A. Chemical state of heterocyclic aromatic amines in grilled beef: evaluation by in vitro digestion model and comparison of alkaline hydrolysis and organic solvent for extraction. Food Chem Toxicol. 2013;62:653–60.
- 17. Darwish WS, Ikenaka Y, Nakayama S, Mizukawa H, Thompson LA, Ishizuka M. β-carotene and retinol reduce benzo[a] pyrene-induced mutagenicity and oxidative stress via transcriptional modulation of xenobiotic metabolizing enzymes in human HepG2 cell line. Environ Sci Pollut Res Int. 2018;25:6320–8.
- 18. Devadoss D, Ramar M, Chinnasamy A. Galangin, a dietary flavonol inhibits tumor initiation during experimental pulmonary tumorigenesis by modulating xenobiotic enzymes and antioxi- dant status. Arch Pharm Res. 2018;41:265–75.
- 19. Yuan JM, Stepanov I, Murphy SE, Wang R, Allen S, Jensen J, et al. Clinical trial of 2-phenethyl isothiocyanate as an inhibitor of metabolic activation of a tobacco-specific lung carcinogen in cigarette smokers. Cancer Prev Res. 2016;9:396–405.
- 20. Kiruthiga PV, Karthikeyan K, Archunan G, Pandian SK, Devi KP. Silymarin prevents benzo(a)pyrene-induced toxicity in Wistar rats by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes. Toxicol Ind Health. 2015;31:523–41.
- 21. Khariwala SS, Ma B, Ruszczak C, et al. High level of tobacco carcinogen-derived DNA damage in oral cells is an independent predictor of oral/head and neck cancer risk in smokers. Cancer Prev Res. 2017; 10:507–13.
- 22. Шлейкин А.Г., Уварова Н.А., Жанчипова О.Э., Данилова Е.А., Шульга А.С., Борисюк Р.Ю. Спектрофотометрическая оценка и безопасность мясного сырья и мясопродуктов // Фундаментальные исследования. 2006. № 1. С. 50-50; URL: http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=4634
- 23. Shleikin A.G. Factors modifying contents of mutagenic substances in meat. Proc. 54th Meat Industry Conference. Beograd, 2007. pp. 42-44.
- 24. Shleikin A.G. The precursors and modifying factors of geterocyclic amines in the meat. Meat Technology. 2007. Vol. 48. No. 5-6. pp. 222-224.
- 25. Шлейкин А.Г. Влияние вида тепловой обработки и температуры на содержание гетероциклических аминов в мясных продуктах. Сборник трудов МНПК «Проблемы интенсификации интеграции науки и производства». 2006. С. 249-251.
- 26. Шлейкин А.Г. Содержание гетероциклических аминов в пищевых продуктах. Мат. МНПК «Продукты питания и пищевая безопасность». 2006. С. 168-170.

ПРОБЛЕМЫ ТЕОРИИ И ПРАКТИКИ ХИМИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНСКОМ ВУЗЕ

УДК 378.016: 577.1

Бейшебаева Ч.Р.

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург chinar17@yandex.ru

Метод «ассистирования» в преподавании биохимии

Статья посвящена описанию и анализу педагогического опыта активации познавательной деятельности студентов медицинского вуза посредством технологии «ассистирования» по дисциплине «Биохимия». Путем анкетирования студентов были уточнены положительные и отрицательные стороны такого занятия. Яркие эмоции, повышенная ответственность за ее результат способствовали лучшему усвоению учебного материала.

Ключевые слова: образовательный процесс, методы обучения, преподаватель, студент, биохимия, технология «ассистирования».

Beishebaeva Ch. R.

Mechnikov North-Western State Medical University Saint Petersburg

Method «assistance» in teaching biochemistry

The article is devoted to the description and analysis of the pedagogical experience of activating the cognitive activity of medical university students through the technology of "assistance" in the discipline of biochemistry. By guestioning students the positive and negative aspects of such classes were clarified. Bright emotions, increased responsibility for it is result contributed to the better assimilation of the educational material.

Key words: education process, method of teaching, teacher, student, biochemistry, «assistance» technology.

Активизация образовательной деятельности студентов в медицинском вузе остается важной проблемой педагогики. На современном этапе развития высшего медицинского образования актуальным

остается вопрос перехода к новому типу обучения. Современное образование представляет студента не как пассивного получателя знаний, а как активного участника процесса обучения [9]. Особое внимание в высшей медицинской школе уделяется развитию умственных способностей. Современные взгляды на творческий процесс ведут к возникновению новых образовательных подходов в учебном процессе [3, 4]. Целью такого обучения является повышение образовательного потенциала, совершенствование способности к овладению новыми, все возрастающими знаниями, развитие самостоятельности в принятии ответственных решений, акцентирование субъектности личности студентов [2, 12, 13]. Методологическим инструментарием в инновационной деятельности медицинского университета является активное использование новых образовательных технологий. Обучение будущих врачей должно обеспечивать полноценное развитие личности студента и формирование профессионального мастерства с использованием компетентностного подхода. Такое обучение позволяет оптимизировать учебный процесс и сформировать у выпускника способности действовать в различных профессиональных ситуациях [3, 6].

Одним из необходимых факторов, способствующих решению этих проблем, являются современные технологии, применяемые в процессе обучения. Использование инновационных образовательных технологий оказывает существенное влияние на качество преподавания, так как позволяет перейти от традиционного монологического изложения материала к педагогике творческого сотрудничества [1]. Особое значение, на наш взгляд, в настоящее время приобретает использование коммуникационных технологий в преподавании фундаментальных дисциплин, которые являются наиболее сложными для студентов [10]. Одной из фундаментальных дисциплин в подготовке будущего врача является биохимия. Она охватывает огромную предметную область, в которую входят все проявления жизни на базовом, молекулярном уровне. Будущий врач должен иметь правильные представления о процессах жизнедеятельности здорового и больного организма, о методах диагностики патологических состояний. Неумение интерпретировать результаты биохимических анализов может стать источником диагностических ошибок, а владение биохимическими исследованиями повышает уровень профессиональной компетентности. Как показывает практика, студент испытывает трудности в освоении содержания этой дисциплины, во многом объясняется недостаточным уровнем подготовки абитуриентов по химии и биологии, а также необходимостью изучения и запоминания огромного количества теоретического материала. Следствием этого является отсутствие у определенной части студентов познавательного интереса к биохимии. Решение этой проблемы предлагается во многих публикациях, авторы которых предлагают использовать активные, нетрадиционные технологии [5, 6, 7, 8].

На кафедре биологической и общей химии метод или технология «ассистирования» используется в учебном процессе на лечебном, медико-профилактическом и факультете иностранных учащихся второго курса. Этот метод представляет собой один из способов обучения, который позволяет совместить управление познавательной деятельности студентов с развитием их личностных качеств и прекрасной возможности для самореализации и самоутверждения. Данная статья основана на результатах работы в тех студенческих группах, где был применен метод «ассистирования». Вышеупомянутой технологии преподавания в специальной литературе не уделено должного внимания, а научные и педагогические работы, в которых упоминалось бы ее использование в учебном процессе медицинских вузов, практически отсутствуют, несмотря на то, что она относится к активным формам обучения. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение возможности активного использования способа «ассистирования» в процессе преподавания такой сложной дисциплины как биохимия. Метод «ассистирования» иначе можно представить как форму, технологию проведения занятия с привлечением так называемых соведущих или «ассистентов» из числа студентов группы. Такая технология использовалась в течение нескольких лет в тех студенческих группах, где был хороший или высокий образовательный и интеллектуальный потенциал. В группах с низким потенциалом такие занятия не проводились ввиду возникновения риска их «провала». Поэтому выбирались группы, где учатся студенты с высоким процентом заинтересованности и мотивированности, с достаточно адекватной самооценкой, желающих самоутвердиться и склонных к саморазвитию. Темы занятий были использованы самые разные. Это «Водорастворимые витамины», «Аэробный путь окисления углеводов», «Обезвреживание аммиака», «Регуляция обмена веществ, «Сигнальные вещества» и другие. Соведущие или «ассистенты» были из числа желающих или назначались преподавателем по два человека из каждой группы. Подготовка к проведению такого занятия начиналась заранее, за 1-2 недели. С «ассистентами» проводилась предварительная беседа об этике преподавателя, манере вести беседу, дискуссию, нюансы в работе преподавателя. Они были ознакомлены с теми приемами ведения занятия, которые использовались ранее другими группами, т.е учитывал-

ся опыт предыдущих групп. Преподаватель подробно разъяснял соведущим вопросы, разбираемые по теме предстоящего занятия, помогал в подборе литературы, акцентировал внимание на самых важных моментах разбираемой темы. «Ассистентами» были использованы самые разнообразные формы проведения занятия и проверки знаний. Например, применение карточек с названиями метаболитов, ферментов, коферментов при разборе обменных процессов, а также составление биохимических кроссвордов из названий основных метаболитов тех или иных реакций. При проведении занятия по теме «Витамины» были использованы настоящие продукты питания (хлеб, молоко, овощи, фрукты). Наглядная сторона такого подхода была достойно оценена одногруппниками. После объяснения биологической роли витаминов эти продукты были уже со знанием дела и успешно использованы в роли полезного обеда. Особо следует остановиться на моменте занятия, с которым сталкивается любой преподаватель — это вызов студента к доске для ответа. Соведущими были предложены разные способы. Из группы ФИУ (факультет иностранных учащихся) одна из «ассистентов» используя считалку на испанском языке, вызывала студентов отвечать к доске. Сладким поощрением за правильные ответы были конфеты. Вопросы для студентов могли быть скрыты под бумажными карточками в виде «звезд», «шаров», «человечков», которые прикреплялись на доску. Такие приемы придавали положительный эмоциональный характер занятию и способствовали лучшему запоминанию. «Ассистенты» часто использовали методы соревновательного характера, задания на время (написание реакций, правильное составление карточек с написанными компонентами определенного сигнального пути и др.).

В представленной статье использованы результаты опроса, проведенного среди студентов, окончивших третий курс и завершивших обучение в университете в этом году. Опрос был проведен методом анкетирования. Были предложены два варианта анкет. Первая форма анкет была предназначена для тех студентов, которые вели занятие в группе, то есть являлись «ассистентами» или соведущими преподавателя. Вторая форма анкет была использована всеми остальными студентами. В каждой анкете содержалось по двенадцать вопросов. Анкетирование показало, что в роли «ассистентов» 86,8% студентов на других кафедрах ранее не выступали и только 14,2% указали, что были соведущими. В большинстве групп «ассистенты» назначались преподавателем, в других решение вести занятие было принято самим студентом или кандидатура выдвигалась одногруппниками. Самым сложным при подготовке к выполнению роли «ассистента» по мнению ребят были следующие моменты. Это — «проработать весь

материал в той мере, которая потребуется для объяснения и проверки знаний», «сформировать правильно вопросы для оценивания глубины знаний», «определить сложные вопросы темы, которые обязательно должны быть освещены», «выявить моменты необходимые студентам в дальнейшем практическом применении и важные в фундаментальном и теоретическом смысле», дефицит времени. Плюсами таких занятий студенты-ведущие считали: яркие эмоции, некий «team building»; материал изучался в 1,5-2 раза внимательней и усердней чем обычно; повышение ответственности; приобретение опыта публичной работы; снижение стеснительности; улучшение запоминания и закрепления материала. По мнению других «ассистентов» – студенты сидят на занятии более расслабленными, с большей охотой идут отвечать к доске, меньше переживают из-за ошибки при ответе, студенты вели себя с ведущими на «равных». Минусами этих занятий «ассистенты» назвали сильное и неизбежное волнение, длительную подготовку, требующая больше времени, неполноценное оценивание («так как они являются твоими друзьями»). Со слов одного из ведущих минусом может быть то, что «все остальные предметы могут уйти на второй план при подготовке, но это скорее всего вопрос «тайм менеджмента». «Ассистенты» с отличными знаниями и уверенных в себе, отметили, что никаких минусов в таких занятиях нет.

На вопрос «Изменилась ли ваша точка зрения на серьезность и важность работы преподавателя?» все ведущие без исключения ответили, что не изменилась, а наоборот, начали по-новому относиться к работе преподавателя. Один из них выразил свою мысль так: «скорее всего я начал понимать как по-разному можно выполнять эту работу». Занятия оказались показательными для студентов-ведущих. Были указаны такие моменты как легкость усвоения информации одногруппниками, серьезность отношения к выполнению своей работы («держать роль»). Проведение занятия явился для них отличным способом наилучшего и полного изучения темы и запоминания на более длительное время. Несомненным позитивным фактором оказалось, что эти занятия «придают рутинным занятиям интерес и интерактив», некоторым «стала явной разница между клинически и теоретически важными знаниями». На вопрос «Трудно ли было оценивать?» 71,6% ведущих ответили, что испытывали трудность и они же считают, что одногруппники были подготовлены лучше, а 28,4% «ассистентов» считают, что оценивать было легко и они же придерживались мнения, что одногруппники были подготовлены как обычно. Для улучшения занятий «ассистентами» были даны следующие советы: больше контакта с преподавателем при подготовке, четкое распределение во-

просов между ведущими, свести к минимуму прямые рекомендации со стороны преподавателя для избегания «рамок в их творчестве» и рекомендовали для будущих ведущих «больше учить и улыбаться», лучше продумывать план занятия, «не растягивать» его. По второй анкете были заданы вопросы другого плана. Занятия с ведущими вызвали интерес у большей части студентов (87,5%) и они же считают, что их знания были оценены адекватно, в противоположность 12,5% студентов – ответили, что занятие их не заинтересовало и оценивали их неправильно. Интерес был вызван в первую очередь сменой привычного формата занятий. Интрига заключалась по мнению 54,5% опрошенных в необычности ситуации, 27,5% — в смене ролей (ведущие – твои одногруппники) и 18% – справятся ли с работой «ассистенты». На присутствие волнения при опросе ведущими указали 63,5% студентов и такое же количество «переживало» за ведущих, а 37,5% студентов ни за себя, ни за ведущих не волновались. Подавляющая часть студентов (75%) показала, что отвечать соведущим было легче, чем преподавателю из-за отсутствия переживаний, боязни ошибиться; сама обстановка способствовала более обдуманным ответам. В качестве положительных сторон таких занятий студенты отметили: лучшее восприятие материала, большую сосредоточенность на вопросах и вовлеченность в обсуждение, вступление в спор, исчезновение страха публичного выступления. Для улучшения такого занятия обучающиеся предложили дать возможность каждому студенту подготовить или проработать определенную часть темы (составление тестов, кластеров, схем, фильмов по выполнению лабораторной работы) и продемонстрировать свои знания.

Опыт преподавания дисциплины «Биохимия» показал, что обучение с использованием метода «ассистирования» обладает мощным потенциалом для решения основной педагогической задачи — побуждение студентов к активной учебно-познавательной деятельности. Применение технологии «ассистирования» позволяет на качественно новом уровне организовать процесс обучения, сделать его более ярким, динамичным, что способствует достижению основной цели — формированию у студентов профессиональных компетенций. Такие занятия показали, что преподавателю нужно акцентировать внимание на личности студента, на психолого-физиологических аспектах обучающегося, особенностях характера, его способностях, знаниях и умениях. Преподавателю дисциплины «Биохимия» следует не только традиционно проводить занятия, но и искать оптимальные возможности включения активных форм в обучение, соотносить их с другими методами, направлять творческий потенциал студентов на решение поставленных задач, вызывать познавательный интерес студентов.

Список литературы

- 1. Алексеева С. Н., Антипина У. Д., Протодьяконов С.В., Антипин Г. П. Педагогический опыт в преподавании дисциплины «Патофизиология» //Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. Серия «Медицинские науки». 2017. №1(06). С.50-54.
- 2. Бабанский Ю.К. Педагогика: учеб. пособие / Под ред. Ю. К. Бабанского. М.-Просвещение, 1983. С. 203-204.
- 3. Гаранина Р. М., Гаранин А. А. Методика проведения занятия методом кейс-анализа в медицинском вузе //Высшее образование в России. 2016. №2 (198). С. 131-136.
- 4. Гладкая Е.Ф. Игра как средство активизации познавательной деятельности студентов // Высшее образование в России. 2018. Т.27. № 10. С. 161-167.
- 5. Жигулина В.В. Инновационные технологии в преподавании биохимии в вузах медицинского профиля // Здоровье и образование в XXI веке: электронный научно-образовательный вестник. 2015. №4 (17). [Электрон.ресурс].
- 6. Князева Л. И. и соавт. Педагогические технологии в учебном процессе кафедры медицинского вуза // Высшее образование в России. 2017. № 3 (210). С. 146-150.
- 7. Князева М. В. Инновационные подходы к преподаванию биохимии в медицинских вузах / Под ред. М.В.Князевой. Инновационные подходы к развитию медицины, фармацевтики и эколого-биологических исследований. Одесса: КУПРИЕНКО СВ. 2015. 192с.
- 8. Ломакина О. В. Трудности в применении интерактивных методов обучения // Высшее образование в России. 2014. № 11. С. 157-158.
- 9. Нюдюрмагомедов А.Н., Ибрагимов Н. Г., Савзиханова М.А. Развитие самоорганизации студентов на основе интерактивных технологий обучения // Высшее образование сегодня. 2020. № 5. С. 48-52.
- 10. Тепляшина Е.В. Использование информационных технологий в преподавании дисциплины «Биохимия» студентам медицинского университета // Образование и наука. 2016. № 9 (138). С. 90-108.
- 11. Чхаидзе З. А., Ходели Н.Г., Парцахашвили Д.Д., Пилишвили О.Д. Приобщение студентов-медиков бакалавриата к элементам экспериментальной хирургии // Вестник КазНМУ. 2015. № 2. С. 319-322.
- 12. Шукшина Т. И., Мовсесян Ж. А. Формирование дидактической компетентности студентов в процессе самостоятельной работы // Высшее образование в России. 2017. № 10 (216). С. 83-87.

13. Vaganova O.I., Medvedeva T. Y., Kirdyanova E. R. Innovative Approaches to Assessment of Results of Higher School Students Training // International Journal of Environmental and Science Education. 2016. № 11 (13). P. 6246-6254.

УДК 613.292

Ватутина И.В., Зотова Е.Е., Пономарева Н.И. ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», Воронеж vatutina_iv@mail.ru, zotova1109@yandex.ru, kafneorgyma@yandex.ru

Самостоятельная работа при изучении биологически активных добавок к пище

Биологически активные добавки (БАД) к пище часто становятся необходимым компонентом для здоровья современного человека. Систематизация информации о БАД в настоящее время является актуальной проблемой. Для ее решения предложен пример организации самостоятельной работы.

Ключевые слова: биологически активные добавки к пище, информация, самостоятельная работа.

Vatutina I.V., Zotova E.E., Ponomareva N.I. FSBEI HE «Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko», Voronezh

Unsupervised training in the study of biologically active food additives

Biologically active food additives (BAA) are often become a necessary component for the health of modern people. Systematization of information about BAA is currently an urgent problem. To solve this problem, we offer an example of organizing unsupervised training.

Key words: biologically active additives (BAA) to food, information, unsupervised training.

Биологически активные добавки (БАД) к пище в настоящее время все чаще становятся необходимым компонентом для здоровья современного человека. Согласно документации Евразийского эконо-

мического союза БАД относят к пищевой продукции и представляют собой природные и (или) идентичные природным биологически активные вещества, а также пробиотические микроорганизмы, предназначенные для употребления одновременно с пищей или введения в состав пищевой продукции [1].

Информация о БАД к пище часто обновляется и дополняется, что требует постоянного изучения соответствующих источников информации, в том числе в процессе обучения в медицинском вузе. Систематизация информации о БАД в настоящее время является актуальной проблемой.

Поэтому цель самостоятельной работы обучающихся при изучении БАД может быть связана с анализом современных источников информации и систематизации представлений о классификации БАД, особенностях контроля их качества и безопасного использования в Российской Федерации.

Для достижения этой цели можно выделить следующие задания.

- 1. Для выбранного и согласованного с преподавателем БАД к пище изучить информацию на упаковке и сверить ее с данными из Единого реестра свидетельств о государственной регистрации (СГР) [2].
 - 2. Классифицировать БАД к пище по четырем признакам:
 - функциональное воздействие,
 - происхождение,
 - цель применения (рекомендации к применению),
 - класс соединения (химическое строение) основных компонентов.
- 3. Описать особенности регистрации, контроля оборота БАД к пище в Российской Федерации.

При выполнении таких заданий обучающиеся должны будут самостоятельно найти в интернете основные документы и источники информации. Единый реестр свидетельств о государственной регистрации позволяет получить следующую информацию для БАД к пище: номер свидетельства, статус, типографский номер бланка, дата оформления документа, наименование продукции, наименование изготовителя, наименование получателя, нормативная документация, область применения, протоколы исследований [2].

В соответствии с МУК 2.3.2.721-98 по функциональному воздействию БАД различают нутрицевтики, парафармацевтики и эубиотики [3,4].

Согласно Справочнику лекарств РЛС® возможна классификация БАД с учетом животного, растительного или минерального происхождения [4,5]. Кроме того, можно выделить химически синтезированные БАД, которые не могут быть показаны большинству людей, так как возможны аллергические реакции, эффект привыкания.

Регистр БАД — Единый электронный справочник биологически активных добавок содержит 17 категорий БАД с учетом рекомендаций по их применению [6]. Подобная классификация применяется также отдельными специалистами [4,7].

С учетом МР 2.3.1.2432-08 [8] подобно микронутриентам возможно выделение следующих классов БАД по химическому строению (класс химических соединений) основных компонентов:

- минеральные вещества;
- витамины и витаминоподобные вещества;
- природные индолы;
- флавоноиды и изофлавоноиды;
- фитостерины и другие.

Кроме того, при классификации БАД возможно применение обобщенной классификации микронутриентов [7]:

- витамины;
- витаминоподобные вещества;
- макроэлементы;
- микроэлементы;
- микронутриенты белковой природы (аминокислоты, полипептиды);
- микронутриенты липидной природы (омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, гамма-линоленовая кислота, фосфолипиды и липотропные вещества, фитостерины);
- микронутриенты углеводной природы (пищевые волокна, неусваиваемые олигосахариды или пребиотики, полисахаридные адьюванты);
- живые кишечные микроорганизмы (пробиотики);
- пищеварительные ферменты растительного происхождения;
- парафармацевтики (гликозиды, алкалоиды, индолы и изотиоционаты, органические полисульфиды, фитоэстрогены, сапонины, фитостерины, терпены и др.) пищевых продуктов.

При этом многие БАД содержат комплекс веществ, что затрудняет классификацию. Одновременная классификация по разным признакам позволяет получить более полную информацию о БАД.

Контроль качества и безопасности БАД к пище осуществляет Роспотребнадзор, что отражается на сайте организации https://rospotrebnadzor.ru. Название организации, которая проводит исследования качества БАД к пище, приводится в протоколе исследований. Статус СГР должен быть связан с указанной нормативной документацией (ТР ТС [1]).

Таким образом, изучение современной информации и формирование представлений о классификации БАД, особенностях контроля их качества и безопасного использования в Российской Федерации может быть вынесено на самостоятельную работу при изучении БАД. Такая работа научит обучающихся искать необходимую документацию в интернет-пространстве, работать с ней, систематизировать знания о видах и способах классификации БАД, о процедуре регистрации и контроле за оборотом БАД в РФ. А возможность поработать с конкретным БАД, подержать его в руках и узнать о его применении и особенностях, делает обучение более предметным и более интересным для обучающихся, что способствует повышению мотивации — одной из главных задач процесса обучения.

Список литературы

- 1. TP TC 021/2011 О безопасности пищевой продукции. URL: http://www.eurasiancommission.org/ru/nae/news/Documents/TR%20 TS%20PishevayaProd.pdf. (дата обращения: 14.09.2020).
- 2. Единый реестр свидетельств о государственной регистрации. URL:http://www.eurasiancommission.org/ru/docs/Lists/List/DispForm. aspx?ID=4. (дата обращения: 14.09.2020).
- 3. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище: Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 1999. 87 с.
- 4. Современные социально-экономические процессы: проблемы, закономерности, перспективы. Арасланова В.А., Байкеева С.Е., Бикмурзина Н.С. и др. монография. Под общ. ред. Г. Ю. Гуляева. Пенза, 2018. С. 115-123.
- 5. Справочник лекарств РЛС® URL:https://www.rlsnet.ru/baa_classif.htm (дата обращения: 14.09.2020).
- 6. Регистр БАД Единый Электронный Справочник Биологически Активных Добавок. URL: http://registrbad.ru/bad/klassifikatorbad (дата обращения: 14.09.2020).
- 7. Гичев Ю.Ю., Гичев Ю.П. Новое руководство по микронутриентологии (биологически активные добавки к пище и здоровье челове-ка). Москва: Триада-X, 2009.
- 8. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. —36 с.

Витязева О.В., Наумова Л.А.

Государственный университет морского и речного флота имени адмирала С. О. Макарова, Санкт-Петербург kaf_chemistry@gumrf.ru

Применение комплексной самостоятельной работы в химико-биологическом образовании студентов

Современные образовательные стандарты высшего профессионального образования ориентированы на перераспределение учебной нагрузки в пользу самостоятельной работы студентов. Методика комплексной самостоятельной работы способствует активизации учебного процесса, индивидуализации обучения, развитию самостоятельности обучаемых.

Ключевые слова: самостоятельная работа студентов, индивидуализация обучения, комплексный подход.

Vitjazeva O.V., Naumova L.A.

Admiral Makarov State University of Maritime and Inland Shipping Saint Petersburg

Application of complex independent work in chemical and biological education of students

Modern educational standards of higher professional education are aimed at redistributing the academic load in favor of independent work of students. The method of complex independent work contributes to the activation of the educational process, individualization of training, and the development of students 'independence.

Key words: independent work of students, individualization of training, a comprehensive approach.

Смена парадигмы современного высшего образования ориентирует студентов вузов на сознательный и активный процесс обучения, основанный на продуктивной самообразовательной деятельности. При этом происходит перераспределение учебного времени в пользу самостоятельной работы, что требует ее эффективной организации. Иными словами, одной из основных целей учебного процесса в вузе является активизация индивидуальной самостоятельной работы студентов в течение всего учебного года, а связанные с этим задачи состоят в ее рациональном планировании, организации и контроле.

На наш взгляд, современным требованиям высшего образования, в том числе химико-биологического образования в медицинском вузе, может служить методика комплексной самостоятельной работы студентов (СРС).

Комплексность (от лат. complexus — связь) — это полнота, системность, взаимоувязанность какого-либо объекта, явления, процесса, в нашем случае процесса самостоятельной работы. Комплексность выражает требование полноты рассмотрения объекта во всем много-образии его элементов и их показателей. То есть, с другой стороны, комплексность подразумевает единство целевого, содержательного и организационного компонентов самостоятельной работы.

Комплексный подход направлен на всестороннее развитие личности посредством комплексного решения образовательных задач и основан на взаимосвязи и взаимообусловленности различных сторон образовательного процесса. В процессе СРС комплексный подход реализуется поэтапно, на уровне:

- 1) постановки и решения комплекса учебных задач; 2) выбора и реализации комплекса компонентов содержания учебной дисциплины;
- 3) отбора и применения комплекса различных методов и средств CPC:
- 4) осуществления комплексов оптимальных форм организации CPC:
- 5) учета комплекса условий учебного процесса (учебно-материальных, санитарно-гигиенических, морально-психологических, эстетических, эргономических);
- 6) комплексной организации и управления, построенных на взаимосвязанной деятельности преподавателя и студентов;

7) комплексной оценки и учета результатов СРС. Комплексная самостоятельная работа — это самостоятельная работа, учитывающая в комплексе дидактические цели, характер образовательной деятельности, формы организации и разнообразие выполняемых учебных действий [1].

Предлагаемая нами система комплексной СРС имеет многоэтапный характер. Так, в зависимости от доминирующей дидактической цели самостоятельная работа должна включать в себя следующие основные этапы: СРС при изучении нового материала; СРС в процессе совершенствования и применения знаний и умений; СРС в процессе контроля и оценки знаний и умений. Кроме того, на каждом из этих этапов в зависимости от характера деятельности студентов самостоятельная работа может быть копирующей, эвристической и исследовательской. Важно также применение не только фронтальной и групповой самостоятельной работы, но и личностно-ориентированной. Особое внимание должно быть уделено самостоятельной работе, ориентированной на формирование учебных компетенций, связанных с выполнением различных типов учебных действий (работа с учебной, справочной, специальной литературой, с наглядным пособием, работа над ошибками; выполнение упражнений, домашнего, индивидуального заданий, практической, поисковой работы; решение расчетных, экспериментальных, задач; подготовка сообщений, докладов, написание рефератов, конспектов, статей, отчета о практической работе; защита реферата, индивидуальной творческой работы).

Особенность применения нашей методики состоит в том, что в учебном процессе различные виды самостоятельной работы студентов преподаватель использует в оптимальных соотношениях согласно доминирующей дидактической цели. Приведем в качестве примера задания для самостоятельной работы при изучении темы «Карбоновые кислоты», раздел «Органическая химия».

- 1. СРС при изучении нового материала.
- Копирующая СРС: самостоятельная проработка теоретического материала о карбоновых кислотах по определенному алгоритму; самостоятельная подготовка к лекционным, семинарским, практическим и лабораторным занятиям, самостоятельное выполнение практической части лабораторного занятия по известной методике, с инструкцией преподавателя.
- Эвристическая СРС: самостоятельный поиск, конспектирование необходимой литературы, составление библиографии по отдельным вопросам, например, о применении карбоновых кислот в быту и промышленности.
- Исследовательская СРС: самостоятельное исследование теоретического материала, не выносимого на лекции и семинарские занятия, самостоятельная подготовка сообщений, докладов, рефератов.
- 2. СРС в процессе совершенствования и применения знаний и умений.
 - Копирующая СРС: самостоятельная работа с заданиями репродуктивного характера (например, ответы на контрольные вопросы по алгоритму).

Пример. Двухосновная гидроксикарбоновая кислота, впервые выделенная из незрелых яблок, известна под тривиальным названием «яблочная кислота». Назовите это вещество по заместительной номенклатуре ИЮПАК и укажите функциональные группы в молекуле яблочной кислоты [2].

 Эвристическая СРС: самостоятельная работа с заданиями продуктивного, поискового характера.

В качестве примера может служить самостоятельное составление таблицы «Биологически значимые карбоновые кислоты» с указанием формулы, функциональной группы, названия солей, биологического значения и применения в медицине.

– Исследовательская СРС: самостоятельное выполнение исследовательских, творческих заданий.

Пример. Какие кислоты используются в составе отбеливающих средств? Спрогнозируйте позитивное и негативное воздействие органических кислот на свойства слюны и эмали зуба [3].

3. Комплексная самостоятельная работа студентов в процессе контроля и оценки знаний и умений также включает копирующую, эвристическую и исследовательскую и подразумевает выполнение (защиту) различных тестовых, проверочных работ, химических диктантов, итоговых контрольных работ, индивидуальных творческих работ, содержащих соответствующие виды заданий.

Разработанная методика комплексной самостоятельной работы очень удобна для оценки успешности индивидуальной самостоятельной работы студентов, способствует повышению качества усвоения дисциплины, дифференцированию студентов по уровню подготовки, созданию благоприятной возможности для индивидуализации обучения, стимулированию активности и самостоятельности студентов, формирует у них опыт оценки собственных учебных достижений, который может быть перенесен в будущую профессиональную деятельность.

Список литературы

- 1. Витязева О. В. Комплексная самостоятельная работа студентов // Актуальные вопросы развития науки. Сборник статей 43 Международной научно-практической конференции. 14 февраля 2014 г.: в 6 ч. Ч. 3 / отв. ред. А. А. Сукиасян. Уфа: РИЦ БашГУ, 2014. С. 35 37.
- 2. Практикум по химии (для студентов лечебного факультета) / Учебно-методическое пособие для студентов лечебного факультета / Н. П. Аввакумова, М. А. Криволапова, М. Н. Глубокова, Е. Е. Катунина, И. В. Фомин, А. В. Жданова. Самара: ООО «Волга Документ», 2016. 154 с.
- 3. Степанова И. П., Григорьева М. В., Гринченко Е. Л., Атавина О. В. Интернет-ресурсы в самостоятельной работе по химии студентов медицинского вуза // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. -2017. № 11-2. -C. 286 290.

УДК 378:54

Гавронская Ю.Ю., Середович А.С.

Российский государственный педагогический университет им А.И. Герцена, Санкт-Петербург, gavronskaya@yandex.ru, sacha123bilix2015@gmail.com

Интернет-мемы в технологии эдьютеймента обучения химии

В статье обсуждается идея использования интернет-мемов в технологии эдьютеймента при обучении химии, которая может быть реализована при обучении химии в медицинском вузе. Рассмотрены принципы составления и варианты использования образовательного мема в обучении химии.

Ключевые слова: образовательный мем, эдыотеймент, обучение химии.

Gavronskaya Yu. Yu., Seredovich A.S. The Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint Petersburg,

Internet memes in chemistry learning edutainment technology

The article discusses the idea of using Internet memes in edutainment technology for teaching chemistry, which can be implemented when teaching chemistry at a medical University. The principles of construction and options for using the educational meme in teaching chemistry are considered.

Key words: educational meme, edutainment, chemical training.

Обучение химии в медицинском вузе имеет давние традиции и определенную специфику по сравнению как с университетскими химическими направлениями, так и по сравнению с нехимическими вузами. Программы по химии для медицинских специальностей отличаются своей фундаментальностью и насыщенностью, а их методическое сопровождение выверенными приемами и высокими требованиями к качеству знаний. Вместе с тем, стремление соответствовать вызовам времени и образовательным инновациям позволяет рассмотреть одну из современных образовательных технологий — эдьютеймент, и использование образовательных интернет-мемов по химии как элемент эдьютеймента в медицинском вузе.

Эдьютеймент в узком смысле рассматривают как «обучение с развлечением», в более широком — «обучение с увлечением», вкладывая в определение эдьютеймента элементы основанного на активном вза-

имодействии субьекта с образовательной средой интерактивного обучения, создания эмоционально-мотивационной ситуации, во многих случаях делая акцент на визуализации образов [1, 2].

Одной из малоизвестных тенденций в эдьютейменте является попытка включения интернет-мемов [3, 4]. Наиболее известны примеры использования мемов при изучении иностранных языков, математики и обществознания [4]. Для литературной речи уже довольно долго характерно использование фразеологизмов, которые быстрее и лучше передают как фактический, так и эмоциональный посыл. В сетевом неформальном общении поколения миллениумов подобную и даже большую информативность при меньшей трате времени обеспечивают мемы [5].

Как известно, в простейшем варианте мем состоит из двух компонентов: визуального и вербального. Визуальный компонент представляет собой изображение; существующая систематизация изображений для составления мемов регулярно дополняется новыми образами, объеденными функцией привлечения внимания и запуска эмоционального отклика. Вербальный компонент этой подписи, их может быть несколько: над и под изображением («зачин» и «развязка») или подписи, соответствующие определённым частям картинки. В интернете несложно найти готовые тематические шаблоны и заполнить их соответствующей информацией.

Идея использования мема основана на понимании и декодировании ситуации и репрезентации ее в новом предметном контенте. В качестве примера рассмотрим проблему написания студентами химических реакций с участием амфотерных гидроксидов. Очевидно, что ее корень заключается в понимании дихотомии в написании амфотерных гидроксидов, которые можно записывать и как основания, например, $Zn(OH)_2$ и как кислоты H_2ZnO_2 . В данном случае мы выбрали шаблон «два Человека-Паука» (https://www.meme-arsenal.com/сгеаte/template/741818), который используется для акцентирования на различии в поведении в зависимости от ситуации. В исходный шаблон были добавлены соответствующие подписи (рис. 1).

После объяснения смысла и формулирования отраженной закономерности возможны замены. Например, вместо гидроксида цинка можно предложить другие амфотерные гидроксиды и записать их формулы в виде кислоты и в виде основания. Отметим, что студенты активно включаются в составление мемов, предлагая другое вербальное наполнение и другие шаблоны, уточняя смысл понятия на основе воспринятой логики.



Рис. 1. Мем о различных вариантах записи амфотерных гидроксидов.

Достаточно простой и популярный в сетевых химически сообществах мем с лягушонком Пепе (рис. 2) не походит для кодирования сложных логических операций, однако, возможно его использовать как маркер для подчеркивания сложных элементов содержания.



Рис. 2. Мем для подчеркивания сложных элементов содержания и /или постановки проблемного вопроса

В формате мема на рис. 2 можно не только подчеркнуть субъективно новые или забытые формулы, но и оригинально поставить проблемный вопрос. В данном случае обсуждается реакция «амфотерный гидроксид+щелочь» $Al(OH)_3+NaOH=NaAlO_2+2H_2O$ при сплавлении. Выигрышем по сравнению с «только текстом» является эмоциональная реакция. Для рассмотрения реакции в растворе $Al(OH)_3+NaOH=Na[Al(OH)_4]$ используем мем с той же картинкой, изменив текст. Опыт показывает, что повторное использование даже 6 мемов по 3 шаблонам дает уже несколько десятков вариантов, что является отличным тренировочным упражнением.

Тем не менее не стоит рассматривать эдьютеймент как альтернативу академическому образованию, а использование мемов заменой кропотливой учебной работы. Это прием привлечения внимания и запуска логического мышления студента.

Список литературы

- 1. Вавилова А.К., Савельев И.И., Середович А.С. Гавронская Ю.Ю. Особенности обучения химии в условиях современного изменения когнитивного стиля школьников// Актуальные проблемы химического и экологического образования: Сборник научных трудов 66 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, г. Санкт-Петербург, 18—19 апреля 2019 года.— СПб.: Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена, 2019. С.51—57.
- 2. Дьяконова, О.О. Понятие «эдьютейнмент» в зарубежной и отечественной педагогике // Сибирский педагогический журнал. 2012. № 6.С. 6—12.
- 3. Загоруйко А. О., Ефремова М. А. Потенциал использования интернет-мемов в качестве обучающего средства //Вопросы методики преподавания в вузе. 2019. Т 8. №. 28. С. 12—21.
- 4. Цаценко Л. В., Савиченко Д. Л. Мемы как форма иллюстрации в науке и образовании // Научный журнал КубГАУ Scientific Journal of KubSAU. 2015. №114. URL: https://cyberleninka.ru/a rticle/n/memy-kak-forma-illyustratsii-v-nauke-i-obrazovanii (дата обращения: 24.03.2019).
- 5. Шурина Ю. Интернет-мемы как феномен интернет-коммуникации // Научный диалог. 2012. №3. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/internet-memy-kak-fenomen-internet-kommunikatsii (дата обращения: 11.09.2020)

УДК 378.016:577

Гайковая Л.Б., Антонова Ж.В., Павлова Р.Н., Соколова М.Н., Голованова Н.Э.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург largaykovaya@yandex.ru, antonova.janna2016@yandex.ru, margsm@yandex.ru, nesh1764@mail.ru

Методические аспекты преподавания учебной дисциплины «Биологическая химия — биохимия полости рта» студентам начальных курсов стоматологического факультета медицинского университета

В статье рассматриваются возможности интерактивных методов преподавания дисциплины «Биологическая химия — биохимия полости рта» студентам начальных курсов, обучающихся по специальности 31.05.03 «стоматология».

Ключевые слова: образовательный кейс, ситуационные задачи, интерактивные методы, тестовые задания, коллоквиум.

Gaykovaya L.B., Antonova Zh.V., Pavlova R.N., Sokolova M.N., Golovanova N.E.

North-Western State Medical University after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg

Methodological aspects of teaching the discipline "Biological chemistry-biochemistry of the oral cavity" to students of the initial courses of the dental faculty of the medical University

We are considering the possibilities of interactive methods of teaching the discipline "Biological Chemistry — Biochemistry of the oral cavity" to students of primary courses studying in the specialty of 31.05.03 "dentistry".

Key words: educational case, situational tasks, interactive methods, test tasks, colloquium.

Методика преподавания такой важнейшей базовой учебной дисциплины как биологическая химия студентам первого (2-й семестр) и второго (3-й семестр) курсов стоматологического факультета имеет ряд существенных особенностей. Это прежде всего, меньшее количество учебных часов, (аудиторных, внеаудиторных для самостоятельной работы) по сравнению с таковым для студентов лечебного факультета. Кроме того, эта дисциплина содержит дополнительный раздел по биохимии тканей и жидкостей полости рта в соответствии с формируемыми общекультурными (ОК), общепрофессиональными

(ОПК) и профессиональными (ПК) компетенциями. Важно учитывать, что контингент учащихся — это студенты начальных курсов стоматологического факультета медицинского университета. Для выполнения задач, поставленных этой учебной дисциплиной, необходимы знания, умения и навыки, формируемые предшествующими дисциплинами, которые у некоторых студентов первого курса в силу личностных адаптационных процессов могли сформироваться недостаточно. Таким образом, все преподавание биологической химии-биохимии полости рта должно быть с одной стороны — адаптировано для понимания студентов младших курсов, с другой стороны — не было упрощено, не утратило свой научности, профессиональной направленности, практической значимости и актуальности. Целью дисциплины «Биологическая химия-биохимия полости рта» является формирование квалифицированного специалиста в области основ диагностики, профилактики, лечения стоматологических заболеваний и повреждений челюстно-лицевой области, взаимосвязи стоматологических заболеваний с соматической патологией.

Для достижения этих целей мы обратились к использованию методов кейс-технологий, которые относятся к интерактивным методам обучения и направлены на активизацию учебно-воспитательного процесса, повышение его эффективности. Был создан образовательный кейс с использованием метода проблемно-ситуационного анализа, который основан на обучении студентов посредством решения конкретных задач-ситуаций, составленных на основе фактического клинического и биохимического материала с целью последующего разбора на учебных занятиях. Ситуационные задачи для студентов младших курсов стоматологического факультета разработаны: с учетом профессиональной ориентации и включают перечень типичных клинических и биохимических изменений в ротовой полости; с учетом актуальности и клинической значимости; соответствуют рассматриваемым темам, целям и задачам в соответствии с ОК, ОПК, ПК; выравнены по критерию трудности и соответствуют возможностям студентов на данном этапе обучения. При решении ситуационных задач студенты осуществляют альтернативный поиск оптимальных решений анализируемой ситуации, возможна выработка нескольких вариантов решения учебной задачи и, в связи с этим, развитие студенческой дискуссии совместно с преподавателем. Такая форма обучения относится к интерактивной и связывается с деятельным участием студентов в процессе обучения, взаимодействием студентов с преподавателем, друг с другом, с учебным окружением [1]. В результате такой работы происходит мотивация студентов к познавательной активности, формирование

креативного мышления, создается доброжелательная атмосфера для высказывания различных точек зрения, приобретается опыт работы в команде. Обучение становится живым, интересным, не смотря на изобилие теоретического материала, что важно для студентов младших курсов. Интерактивная направленность обучения проявляется здесь также в совместной работе преподавателя и творчески-активных студентов при создании набора плакатов и таблиц стендового типа, необходимых для информационной части обучающего кейса. Совместными усилиями были сделаны плакаты (схемы, рисунки, таблицы) по разделу «Биохимия полости рта»: «Строение модуля слюноотделения. Механизм формирования слюны», «Классификация коллагенов», «Регуляция слюноотделения», «Белки соединительной ткани», «Строение мицеллы слюны», «Образование дезоксипиридинолиновых и пиридинолиновых ковалентных сшивок в коллагеновых волокнах костной ткани», «Образование активного остеокласта и его участие в резорбции костной ткани» и многие другие. Образовательный кейс для студентов стоматологического факультета имеет информационную составляющую, ситуационно-аналитические задачи, вопросы и задания к этим задачам. В нашем случае мы разработали печатный (опубликованный) кейс [2], при этом существует и его электронная версия. Информационная часть кейса и ситуационно-аналитические задачи с вопросами и заданиями к ним находятся в разных печатных изданиях, что методически допустимо и оправдано. Задачи и задания с вопросами находятся в тех темах различных разделов, на которых они разбираются и опубликованы в соответствующих учебно-методических изданиях [4,5,6,7], а вся информационная часть кейса — в отдельном пособии [2]. При решении ситуационных задач во внеаудиторное время студенты могут воспользоваться материалами кейса, которые включают специально переработанные, адаптированные, кратко изложенные материалы статей, монографий, научных справочников и других информационных источников [2]. Пособие содержит дидактический материал, таблицы, графики и рисунки, позволяющие быстро и эффективно повторить или изучить связь метаболических нарушений в организме с состоянием зубочелюстной системы и изменениями в жидкостях полости рта при решении ситуационных задач. Там же описаны новые диагностические возможности лабораторных тестов и биохимических показателей крови, мочи, слюны, десневой жидкости. Студенты изучают нарушения метаболических процессов обмена веществ, в том числе нарушений в зубочелюстной системе, возникающих при развитии различных заболеваний [2]. Теоретическая основа кейса подготовлена в соответствии

с требованиями ФГОС 3+ для контроля и оценки овладения компетенциями (ОК, ОПК, ПК) или их частями, которые должны формироваться при обучении студентов стоматологического факультета в рамках общепрофессиональной и профессиональной подготовки. Студенты изучают кейс, материалы учебника, лекционного курса и решают задачи по поставленным к ним вопросам и заданиям. Отдельные студенты или подгруппы представляют свои решения. Преподаватель оценивает и комментирует ответы, при необходимости корректирует презентуемые решения и поддерживает дискуссию в группе. Затем преподаватель и студенты выбирают оптимальное решение, делают выводы и подводят итоги. Решение ситуационных задач с использованием материалов печатного кейса мы используем на разных этапах процесса обучения, в том числе и для оценки уровня усвоения материала по данной теме или разделу.

Для самостоятельной работы студентов разработаны тестовые задания по всем разделам дисциплины «Биологическая химия — био-химия полости рта», различающиеся по форме и темам [3]. Выбор форм тестовых заданий по различным темам определялся целями тестирования и сложностью материала, усвоение которого необходимо проверить. Мы используем тестовые задания как закрытого типа (с альтернативной или множественной выборками, установлением соответствия или последовательности), так и открытого типа, в которых на поставленный вопрос студент должен написать свой вариант ответа (дописать слово, словосочетание, формулу и др.). Содержательная составляющая тестовых заданий направлена не только на проверку знаний, но и на получение обобщенной информации по темам, что помогает студентам активизировать мыслительный процесс и способствует успешному нахождению правильных ответов. Примерно 25% всех тестовых заданий приходится на раздел «Биохимия полости рта» и включает темы, необходимые для формирования профессиональных компетенций [3]. Тестовые задания из учебно-методического пособия «Сборник тестовых заданий по разделам биологической химии и биохимии полости рта» используются при подготовке к практическим и лекционным занятиям во внеаудиторное время, а также входят в перечень контрольно-оценочных средств при проведении коллоквиумов по изученным разделам. Тестовые задания только закрытого типа с альтернативной выборкой мы используем в дистанционном обучении и экзаменационном тестировании студентов.

Еще одна особенность преподавания дисциплины «Биологическая химия-биохимия полости рта» заключается в том, что отдельные темы курса рассматриваются либо только на лекционных занятиях,

либо только на практических занятиях для более рационального использованием учебных часов аудиторного типа. В связи с этим мы разработали и опубликовали в учебно-методических пособиях подробные алгоритмы самоподготовки студентов по этим темам, включающие дополнительную информацию и глоссарий [4, 5, 6, 7]. Наличие глоссария обязательно и имеет большое значение для освоения медикобиологической и биохимической терминологии студентами младших курсов. Для эффективной подготовки к практическим и лабораторным занятиям были написаны учебно-методические пособия по разделам «Биологической химии — биохимии полости рта», являющиеся частью учебно-методического комплекса, созданного для студентов стоматологического факультета [4,5,6,7]. Проводя лабораторные занятия мы развиваем у студентов способность к участию в научных исследованиях, навыки совместной работы в команде и культуры поведения в учебной среде, самостоятельной оценки полученных результатов и их коллективного обсуждения совместно с преподавателем, что также является проявлением интерактивного подхода в обучении. Рабочей программой дисциплины предусмотрено написание каждым студентом реферата по определенной теме курса, которая необходима для формирования ОК, ОПК, ПК. Реферат отражает обзор и анализ (иногда) современных и достоверных источников информации по исследуемому вопросу. Требования к написанию и защите рефератов опубликованы в учебно-методических пособиях для студентов [4,6,7]. Критерии оценки рефератов разработаны и записаны в рабочей программе дисциплины.

Контроль освоения компетенций и текущая проверка знаний по изученным темам и разделам осуществляется на коллоквиумах по контрольным вопросам и тестированию. Интерактивная форма проведения коллоквиумов позволяет преподавателю корректировать, дополнять ответ студента и вовлекать в разбор вопроса других студентов из группы.

Список литературы

- 1. Гавронская, Ю.Ю. Образовательная среда в интерактивном обучении химическим дисциплинам. Сибирский педагогический журнал.-2010.-№ 2.- с.30-40.
- 2. Метаболические нарушения и зубочелюстная система : учебно-методическое пособие для студентов стоматологических факультетов медицинских вузов / под ред. Л.Б. Гайковой, Ж.В. Антоновой, Р.Н. Павловой. СПб. : Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, $2017.-128\,\mathrm{c}.$
- 3. Сборник тестовых заданий по разделам биологической химии и биохимии полости рта: учебно-методическое пособие для студентов

стоматологического факультета / под ред. В.А. Дадали, Ж.В. Антоновой, Р.Н. Павловой.- СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2017.- 176 с.

- 4. Белки. Ферменты. Витамины: учебно-методическое пособие к практическим и лабораторным занятиям по биологической химии биохимии полости рта для студентов стоматологических факультетов медицинских вузов / под ред. Ж.В. Антоновой, Р.Н.Павловой, В.А. Дадали, СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2019 148 с.
- 5. Обмен белков. Матричные биосинтезы: учебно-методическое пособие к практическим и лаборатор-ным занятиям по биологической химии биохимии полости рта для студентов стоматологических факультетов медицинских вузов / под ред. Ж. В. Антоновой, Р. Н. Павловой, В. А. Дадали. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2019. 96 с.
- 6. Обмен углеводов. Энергетический обмен. Гормональная регуляция обмена веществ и функций организма: учебно-методическое пособие к практическим и лаборатор-ным занятиям по биологической химии биохимии полости рта для студентов стоматологических факультетов медицинских вузов / под ред. Ж. В. Антоновой, Р. Н. Павловой, Л. Б. Гайковой. СПб. : Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2019. 100 с.
- 7. Обмен липидов. Биологические мембраны: учебно-методическое пособие к практическим и лабораторным занятиям по биологической химии биохимии полости рта для студентов стоматологических факультетов медицинских вузов / под ред. Ж. В. Антоновой, Р. Н. Павловой, Л. Б. Гайковой. СПб. : Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2020. 76 с.

УДК 37.015.324

Иванова И.С., Попов А.С., Гайковая Л.Б., Власова Ю.А. ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова

Санкт-Петербург, Россия

Ivanova.I@szgmu.ru, aleksei.popov@szgmu.ru, Yuliya.Vlasova@szgmu.ru, Larisa.Gaykovaya@szgmu.ru

Изучение мотивации к обучению в медицинском вузе по анкетированию студентов первого курса медикопрофилактического факультета

С целью усовершенствования методики преподавания дисциплины «Общая химия, биоорганическая химия» было проведено анкетирование

студентов 1 курса медико-профилактического факультета по изучению мотивации к обучению в медицинском вузе. Анализ анкеты был проведен с учётом гендерного подхода.

Ключевые слова: учебная мотивация, гендерный подход, анкетирование.

Ivanova I.S., Popov A.S., Gaikovaya L.B., Vlasova Y.A. N-WSMU named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Research of motivation to study at a medical university based on a survey of first-year students of the faculty of preventive medicine

In order to improve the teaching methods of the discipline "General chemistry, bioorganic chemistry", a survey was conducted for 1st-year students of the faculty of medicine and prevention to study motivation to study at a medical University. The questionnaire was analyzed with a gender approach.

Key words: educational motivation, gender approach, survey.

Дисциплина «Общая химия, биоорганическая химия» является одной из фундаментальных дисциплин для направления подготовки «медико-профилактическое дело» в медицинском вузе. Она служит основой для изучения не только биохимии и фармакологии, но и последующих дисциплин профессиональной специализации врача (клиническая лабораторная диагностика, общая и военная гигиена, токсикология, коммунальная гигиена, гигиена труда, гигиена питания, судебная медицина, микробиология, анестезиология, ревматология и интенсивная терапия и др.) Цель изучения учебной дисциплины «Общая химия, биоорганическая химия» состоит в овладении студентами знаниями на основе формирования системного естественнонаучного представления о строении и превращениях неорганических и органических веществ и принципами, лежащими в основе процессов жизнедеятельности в непосредственной связи с биологическими функциями этих соединений, используемых для оценки воздействии на организм факторов окружающей среды, лечения и профилактики профессиональных болезней, а также физико-химической сущности взаимодействия веществ в организме человека на молекулярном и клеточном уровнях.

Несмотря на высокий конкурс в медицинские вузы, часть первокурсников не обладает необходимым уровнем знаний и умений по химии, что объясняется различными факторами. Одним из факторов может являться недостаточная учебная мотивация. По сужде-

нию многих исследователей (А.А. Реан, В.А. Якунин; К. Замфир; Т.И. Ильина и др.), если студент адекватно оценивает профессию, считает её достойной и значимой для общества, то это положительно влияет на процесс его обучения по выбранной специализации.

С целью усовершенствования методики преподавания дисциплины «Общая химия, биоорганическая химия» нами было проведено анкетирование студентов 1 курса медико-профилактического факультета по изучению мотивации обучения в медицинском вузе. В анкетировании приняли участие 165 студентов (29 респондентов мужского пола и 136 женского), проучившихся на 1 курсе 1 месяц. Исследование проходило в октябре 2019/20 учебного года. При этом генеральная совокупность всего респондентов 173, доверительная вероятность 97%, доверительный интервал погрешность ±% 0,2.

При исследовании мы использовали методику Т.И. Ильиной [2]. Цель методики — выявить преобладающие мотивы обучения студентов-медиков. В методике имеются три шкалы: «приобретение знаний»; «овладение профессией»; «получение диплома». Шкала «приобретение знаний» показывает насколько у студентов сильно стремление к приобретению знаний, любознательность; шкала «овладение профессией» измеряет стремление к профессиональным знаниям и формирование профессионально важных качеств; шкала «получение диплома» представляет стремление студентов к приобретению диплома при формальном усвоении знаний, стремление к поиску обходных путей при сдаче экзаменов и зачетов.

Как показали результаты анкетирования, в целом у студентов 1 курса медико-профилактического факультета преобладают мотивы по первым двум шкалам (шкала «Приобретение знаний» -73,5%; шкала «Овладение профессией» -65%), что свидетельствует об адекватном выборе профессии и удовлетворенности ею.

Как видно из табл. 1, наблюдаются различия по гендерным аспектам в ответах, так у юношей стремление к приобретению знаний, любознательность (75%) — выше, чем у девушек (72%), стремление к профессиональным знаниям и формированию профессионально важных качеств ниже (60%) по сравнению с девушками (70%). Интерес представляет и шкала «Получение диплома» — 62,5% (это средний процент по юношам и девушкам). Эта цифра больше 50% по данной шкале, следовательно, необходимо усилить работу по формированию у студентов понимания того, что выбранная профессия является социально значимой, очень ответственной, от неё зависит жизнь людей, поэтому отношение студентов к обучению должно соответствовать высокому уровню с регулярной проверкой знаний на каждом

занятии. Следует отметить, что стремление юношей к приобретению диплома при формальном усвоении знаний, стремление к поиску обходных путей при сдаче экзаменов и зачетов выше на 7 %, чем у девушек. Отметим, что проведённые результаты анкетирования студентов 2 курса медико-профилактического факультета [1, с. 35] показали, что для большинства студентов представления о биологической химии ассоциируются с потребностями в получении знаний (40%) и опытом профессиональной деятельности педагога-врача (20%). Эти результаты отражают, что уже на 2 курсе идёт представление о химии как о важной дисциплине, для профессионального становления будущих врачей, и понимания ими тесной связи между теоретическими знаниями, полученными при обучении и возможностью применения этих знаний на практике.

Таблица 1. Результаты анкетирования с учётом пола респондента.

		Средний балл в % Пол респондента			
Шкала	Максимум, в баллах				
		женский	мужской		
«Приобретение знаний»	12,6	72	75		
«Овладение профессией»	10	70	60		
«Получение диплома»	10	59	66		

В опроснике также включён ряд фоновых вопросов «для маскировки», которые представляют интерес для нас — педагогов.

На вопрос «Какое из присущих Вам качеств Вы выше всего цените?» по частоте встречаемости у юношей на первом месте — доброта, на втором — трудолюбие, ответственность, упорство, а на третьем — отзывчивость. У девушек соответственно: 1 — упорство, 2 — ответственность и 3 — трудолюбие.

На вопрос «От каких из присущих Вам качеств Вы хотели бы избавиться?» по частоте встречаемости у юношей: 1- лень, 2- прокрастинация, 3- неуверенность, тревожность и никаких. У девушек: 1- лень, 2- невнимательность, 3- тревожность и зависть.

На вопрос «Какое из присущих Вам качеств больше всего мешает учиться?» по частоте встречаемости у юношей: 1- лень, 2- никаких, 3- прокрастинация. У девушек: 1- лень, 2- несобранность и 3- тревожность.

На вопрос «Какое из ваших качеств помогает вам учиться?» по частоте встречаемости у юношей: 1 — трудолюбие, 2 — упорство, 3 — це-

леустремлённость и любознательность. У девушек: 1 — трудолюбие, 2 — целеустремлённость и 3 — организованность.

Результаты анкетирования позволяют сделать следующие выводы:

- 1. Подавляющее большинство студентов медико-профилактического факультета выбрали профессию врача осознанно и удовлетворены своим поступлением в вуз.
- 2. Несмотря на адекватный выбор профессии, результаты по шкале «Получение диплома» свидетельствуют о необходимости использования актуальных методов и форм обучения для совершенствования методики преподавания дисциплины «Общая химия, биоорганическая химия», осуществлять интеграцию с другими учебными дисциплинами медицинского вуза (фундаментальными и профессиональными) усиливая тем самым учебную мотивацию.
- 3. Для того чтобы помочь студентам справится с ленью, прокрастинацией, несобранностью, тревожностью необходимо обучать студентов приёмам самомотивации (планирование, партнёрство, структурирование, награда, расширение, сбережение и другие).

Список литературы

- 1. Маркина Л.Д. и др. Психология педагогической практике: учебное пособие/ кол. авт.; под. общ. ред. Е.В. Левченко; Перм. гос. унт. Пермь, 2010.-172 с. https://studfile.net/preview/7144796/ [09/09/19]
- 2. Власова Ю.А., Гайковая Л.Б. Изучение учебной мотивации к освоению курса биологической химии студентов 2 курса медико-профилактического факультета // В сборнике: Педагогическое взаимодействие: возможности и перспективы. Материалы I научно-практической конференции с международным участием. 2019. С. 32-36.

УДК 61: 378.004.14

Ильинова Т.Н., Пономарева Н.И.

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж tatiana ilinova@mail.ru

Проблемы теории и практики химического образования в медицинском вузе

Предложены способы повышения эффективности образовательного процесса в рамках изучения дисциплины «химия» студентами медицинских

вузов. Описано содержание вариативного блока для студентов медико-профилактического факультета. Отражен компетентностный подход подготовки: интегративность, актуализация, полученная в результате решения конкретных профессиональных задач.

Ключевые слова: компетентностный подход, вариативный курс, физико-химические методы исследования.

Illinova T.N., Ponomareva N.I. N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh

Problems of Theory and Practice of Chemical Education in a Medical University

The ways of increasing the efficiency of the educational process in the framework of studying the discipline "chemistry" by students of medical universities are proposed. The content of the variable block for students of the medical-preventive faculty is described. The competence-based approach of training is reflected: integration, actualization, obtained as a result of solving specific professional problems.

Key words: competence-based approach, variable course, physical and chemical research methods.

Химия — одна из фундаментальных наук, изучение которой в рамках любой образовательной программы студентами медицинских вузов имеет неоспоримее значение. Основы химической науки формируют у студентов: систематизированное знание закономерностей химического поведения биологически важных соединений во взаимосвязи с их строением для использования этих знаний в качестве основы для изучения и понимания процессов, протекающих в живом организме, умение прогнозировать возможное действие на живой организм и химические превращения веществ в организме человека на основе их классификационной принадлежности, создают навыки, необходимые для изучения других дисциплин. Развивается физикохимического и математического аппарат, первичные диагностические навыки на основе клинического анализа биологических жидкостей и т.д.

Однако, несмотря на фундаментальную роль, изучение химической науки реализуется только студентами первых курсов (порядка 1% от суммарного количества аудиторных часов за среднюю продолжительность обучения, составляющую 6 лет). Ограниченность во времени определяет ограничения включений особенностей спе-

циализации будущих врачей при изучении курса, сохраняя исключительно универсальные разделы, интегрированные в медицинскую тематику. Основной идеей данной статьи является необходимость введения вариативного курса химии, ориентированного на решение конкретных медицинских задач с учетом профилирования студентов в дополнение к основному базовому курсу химии. В частности, студентам медико-профилактического факультета, деятельность которых в качестве специалистов непосредственно связана с проведением различного рода анализов, предлагается вариативный блок, направленный на получение практических знаний в данной области — «физико-химические методы исследования в медицине». Блок может включать теоретическую базу с закреплением полученных знаний лабораторным практикумом по темам: вискозиметрия, хроматография, колориметрия, потенциометрия, кондуктометрия и т.д. Это отражает интеграцию химической науки в медицину. В качестве примера, раздел «Хроматография» формирует понимание специфики процессов, происходящих на границах разделов фаз. Знание основ химического анализа методом хроматографии позволяет обнаруживать ферменты, вирусы в анализируемой пробе.

Подготовка врачей с опорой на фундаментальные естественные науки осуществлялась из поколения в поколение. Кафедра химии была одной из первых трех кафедр, основанных М.В. Ломоносовым на медицинском факультете Московского университета [1]. На сегодняшний день анализ уровня подготовки современных студентов в области химической науки и тенденций развития образования приводит к выводу о недостаточном количестве часов учебного аудиторного времени для формирования высокопрофессиональной личности специалиста как на стадии довузовского образования, так и непосредственно в высшем учебном заведении. Мониторинг подготовки студента также является неотъемлемой частью образовательной деятельности и требует временных ресурсов. Оптимальной является оценка не только теоретической базы, но и практических навыков студентов, что с начальных курсов формирует навыки работы с лабораторной посудой, химическими реагентами, лекарственными препаратами. Постоянный анализ обратной связи позволяет корректировать используемые методики при изучении дисциплины, а также уровень усвоения материала. Авторы [2] предлагают в качестве экспресс — способа получения данной информации проведение тестирования. Мы предлагаем сделать упор на круглые столы, защиту конкурсных проектов, тематика которых будет напрямую сопряжена с практическим экспериментом, кейс-метол.

Таким образом, наиболее эффективным, на наш взгляд, способом повышения качества медицинского образования является интеграция базового курса учебной дисциплины и вариативного курса с учетом профилирования студентов, при условии постоянного мониторинга результатов учебного процесса. Подобная форма позволит наиболее полно отразить компетентностный подход подготовки студентов.

Список литературы

- 1. Московский университет в воспоминаниях современников / Сост. Ю.Н. Емельянов. М.: 1989.
- 2. Юдина Т.Г. Опыт использования тестирования в процессе обучения общей химии студентов медицинского вуза. Материалы 55 Всероссийской научно практической конференции химиков с международным участием «Актуальные проблемы химического и естественнонаучного образования». Санкт-Петербург: 2008. С. 231-233.

УДК 378.016:54

Козлова-Козыревская А.Л.

Белорусский государственный педагогический университет имени М. Танка, Белорусский государственный медицинский университет Беларусь, Минск kozyrevskaya@tut.by

Формирование научного мировоззрения студентов при изучении химии

В статье приводится обобщение методик процесса формирования научного мировоззрения студентов при изучении химических дисциплин в вузе и определение его значения, рассматриваются пути использования межпредметных связей в практике обучения.

Ключевые слова: научное мировоззрение, химические знания, учебный процесс, формирование системы философских категорий.

Kozlova-Kozyrevskaya A.L.

Belorussian State Pedagogical Univercity named M. Tank Belorussian State Medical Univercity Belarus, Minsk

Formation of the scientific outlook of students in the study of chemistry

Summary: the article provides a generalization of the methods of the formation of the scientific outlook of students in the study of chemical disciplines

at the university and the definition of its meaning, the ways of using intersubject connections in teaching practice are considered.

Key words: scientific outlook, chemical knowledge, educational process, the formation of a system of philosophical categories.

В современных условиях развития высшего образования актуальной является проблема повышения качества химического образования. Решение данной проблемы тесно связано с реализацией в практике преподавания триединой задачи обучения любой из химических дисциплин — обучающей, воспитательной и развивающей. Химия — предмет естественнонаучного цикла. Главное назначение химических дисциплин — формирование научного мировоззрения студентов, знаний о природе, о методах ее познания. Мировоззрение придает человеческой деятельности организованный, осмысленный и целенаправленный характер. Важность проблемы формирования научного мировоззрения современного студента отмечается большинством как отечественных, так и зарубежных философов, психологов, педагогов и методистов.

Исходя из возможностей предмета и функций обучения, химия вносит существенный вклад в формирование материалистических взглядов и убеждений. Побудительным началом этого являются положительные мотивы обучающихся к усвоению мировоззренческих знаний. Предпосылкой этому служит объективная химическая картина природы, на раскрытие которой направлено на изучение основ химии еще в школьном курсе. На протяжении всего периода обучения химии студенты познают вещества как один из видов материи, а химическую реакцию — как форму его движения. Они экспериментально и теоретически изучают состав, строение, свойства, превращения веществ, усваивая при этом пути химического познания, овладевая его методами.

Через весь курс химии проходит идея развития веществ от простых до сложных белковых соединений и их взаимосвязь. Эти знания служат основой для понимания всеобщих естественных взаимосвязей в природе. На основе знаний о веществе студенты делают мировоззренческие выводы: о материальности мира, о его единстве и многообразии, о его познаваемости [1].

В формировании научного мировоззрения обучающихся велика роль периодического закона как теоретической и методологической основы курса химии. Изучая периодический закон, важно показать его как всеобщий закон развития природы, а периодическую систему — как величайшее обобщение химических знаний об элементах и образованных ими веществах.

Изучение химических реакций как качественных изменений веществ убеждает студентов, что составляющие их атомы при этом не разрушаются. Познание динамики химических превращений веществ показывает, что мир непрерывно изменяется, одни формы существования материи переходят в другие. Материя изменчива, но неуничтожима [2].

По мере накопления мировоззренческих знаний, ознакомления с методами научного познания студенты постепенно овладевают диалектическим подходом к изучению объектов и явлений химии, диалектическим методом их познания, что проявляется во всестороннем рассмотрении на основе межпредметных связей химических явлений в их развитии и взаимосвязи: изучении существенных отношений между ними; раскрытии причин и закономерностей их проявления, источником их развития. В процессе изучения химии студенты постепенно убеждаются, что изученные закономерности протекания химических реакций лежат в основе управления ими в производственных и лабораторных условиях. Постепенно химия предстает перед ними не только как наука, объясняющая мир, но и преобразующая его в ходе человеческой практики. Превращение знаний в убеждения, поиск путей этого процесса — важная учебно-воспитательная задача обучения химии.

Преподаватель на занятиях химии показывает студентам место химической картины природы, специфику характерных для нее черт и общность с другими науками — физикой, биологией. Этим педагог создает базу для формирования у обучающихся философской картины мира [3]. Он может дать студентам первоначальное представление о следующих мировоззренческих идеях: материальность мира, объективное существование материи, единство мира, движение, всеобщая связь явлений природы, взаимосвязь разных форм движения материи, познаваемость мира, истинность и объективное значение научных теорий, бесконечность познания человечеством окружающего мира.

Всю совокупность мировоззренческих знаний можем условно разделить на три группы. В структуру каждой из них входят мировоззренческие идеи, раскрывающие их положения и понятия разной степени общности: философские, общие естественнонаучные, химические [4].

Первая группа условно названа «материальность мира» и содержит положения, раскрывающие мировоззренческие идеи о веществе как одном из видов материи, носителе химической формы движения. Это положение опирается на группу понятий: материя, движение, качество, количество, вещество, генетическая связь, система, многообра-

зие, химический элемент, состав, строение, свойства веществ, гомология, изомерия и т.п.

Вторая группа мировоззренческих знаний условно названа «диалектика природы». Положения этой группы опираются на понятия: движение, развитие, закон, причина, следствие, сущность и явление, часть и целое, развитие, эволюция, простое и сложное, химическое равновесие, взаимное влияние атомов в молекуле и др.

Третья группа названа «диалектико-материалистическим характером процесса познания природы» и благодаря положениям этой группы становится возможным разъяснение таких понятий, как сознание, отражение, истина, идеальное, гипотеза, модель, механизм.

Каждая наука, в том числе и химия, располагая определенной суммой фактов и теорий, обобщающих, объясняющих эти факты и предвосхищающих их открытие, создает свою конкретно-научную картину природы (соответственно определенной форме движения материи). Через теорию познания часть этих представлений включается в философскую картину мира, находящуюся на более высоком уровне обобщения по сравнению с конкретно-научной.

Список литературы

- 1. Боряз В.Н. Философские вопросы химии. Л.: Наука, 2006, 176 с.
- 2. Воронович Б.А. Философские проблемы взаимодействия общества и природы. М.: Мысль, 1982, 234 с.
- 3. Гессен С.И. Основы педагогики. Введение в прикладную философию. М.: Мир, 2015. С. 34-136.
- 4. Смирнова Т.В. Формирование научного мировоззрения учащихся при изучении химии. М.: Просвещение, 2004, 145 с.

УДК 378.016:54

Козлова-Козыревская А.Л., Васильева Н.Г.

Белорусский государственный педагогический университет имени М. Танка, Белорусский государственный медицинский университет Беларусь, Минск kozyrevskaya@tut.by; ogeiko@rambler.ru

Самостоятельная работа по химии на этапе обобщения знаний

В статье приводится одна из методик организации самостоятельной работы по химии среди студентов медицинских и других вузов —

технология «педагогических мастерских», рассматриваются как положительные, так и отрицательные стороны данной технологии.

Ключевые слова: самостоятельная работа студентов, технология «педагогических мастерских», учебный процесс.

Kozlova-Kozyrevskaya A.L., Vasiljeva N.G. Belorussian State Pedagogical Univercity named M. Tank Belorussian State Medical Univercity Belarus, Minsk

Independent work in chemistry at the stage of generalization of knowledge

The article provides one of the methods of organizing independent work in chemistry among students of medical and other universities — the technology of "pedagogical workshops", both positive and negative aspects of this technology are considered.

Key words: independent work of students, technology of "pedagogical workshops", educational process.

Одним из самых доступных и проверенных практикой путей повышения эффективности занятий, активизации знаний у обучающихся является соответствующая организация самостоятельной учебной работы. Она занимает исключительное место на современном занятии, потому что студент приобретает знания только в процессе личной самостоятельной учебной деятельности. Передовые педагоги всегда считали, что на занятиях обучающиеся должны трудиться по возможности самостоятельно, а преподаватель — руководить этим самостоятельным трудом, давать для него материал. Организация самостоятельной работы, руководство ею — это ответственная и сложная работа каждого педагога в любом учебном заведении. Воспитание активности и самостоятельности необходимо рассматривать как составную часть формирования знаний, умений и навыков на этапе обобщения знаний. Эта задача выступает перед каждым преподавателем в числе задач первостепенной важности, поэтому именно ей мы уделяем пристальное внимание при проведении занятий по химии в медицинском вузе. Для формирования знаний, умений и навыков у студентов важно, чтобы учебный материал переосмысливался в единой системе, в возможно более широких и разносторонних связях. Сущность проведения самостоятельных работ заключается в наглядном преобразовании систематических, рядоположных знаний, полученных на занятиях в ходе изучения той или иной учебной темы, в знания, образующие систему.

На основе отдельных восприятий у студентов об изучаемых химических веществах и химических явлениях создаются общие представления и понятия. Это осмысливание и обобщение восприятий в свою очередь влияет на уже имевшиеся представления и понятия — развивают мышление обучающихся. Могучим средством развития мышления служит речь, а также химическая символика и специальная химическая терминология, с помощью которых студенты не только усваивают ранее обобщенный опыт, но осмысливают вновь приобретенные знания — развивают свое мышление [1].

Задача преподавателя на этом этапе процесса обучения состоит главным образом в осмысливании полученных представлений и понятий, в предупреждении формального усвоения сложного учебного материала.

Созданные у обучающихся понятия повторяются и уточняются путем применения их в практике самих студентов. На следующем этапе процесса обучения очень важны специальные упражнения, химические задачи и производственные экскурсии [2].

Преподаватель химии должен обеспечить осмысленное и глубокое знание основ современной химии.

Современный преподаватель систематически, последовательно излагает преподаваемую им дисциплину, приучая студентов к работе с литературой, к различного рода самостоятельным письменным работам, к работе в химической лаборатории. Необходимо систематически приводить обучающихся к самостоятельной работе, широко практикуя различные задания в меру овладения определенным курсом знаний [3].

Методы самостоятельной работы по химии включают в себя: лабораторные работы, практические занятия, решение ситуационных химических задач и работа с химической литературой. Грамотно организованный учебный процесс требует применения не одного, универсального метода, а всего разнообразия существующих методов самостоятельной работы.

Чем разнообразнее методы преподавания химических дисциплин в медицинском вузе, тем восприятие студентами учебного материала более всестороннее, а, следовательно, более осмысленное и более прочное [4].

Нами была взята для проведения занятий по химии у студентов 1-2 курсов одна из передовых технологий проведения занятий — технология «педагогических мастерских». Мастерская — это такая модель обучения, которая позволяет развить творческие способности студентов во время занятий. Одна из основных идей мастерской: каж-

дый человек должен развивать свои способности, возможности, а не копировать кого-то другого. Каковы же были результаты работы с применением технологии «французских мастерских» (данная технология способствует тому, что эпизодически применяемые приемы организации самостоятельной индивидуальной и групповой работы студентов приводятся в систему). Такое обучение предусматривает активную самостоятельную деятельность обучающихся на занятии. Они сориентированы на поиск проблемы и выбор путей ее решения. Исходя из этой технологии, занятия имеют гибкую схему, т.е. учитываются особенности учебного материала и специфика аудитории.

Схема занятия достаточно проста, сводится к тому, чтобы все студенты понимали смысл своей деятельности, чтобы овладели набором умений, навыков и могли применить их в новой ситуации. Этапы занятия: индукция, самоконструкция, социоконструкция, разрыв, социоконструкция, социализация, рефлексия. При этом на каждом этапе высказывается каждый участник мастерской и на этом строится следующий этап работ, ведущий к постижению нового, другого знания. Этапы занятия между собой взаимосвязаны. Цели занятия достигнуты. Выявлен ряд ошибок, которые были допущены студентами. К ним можно отнести ошибки в оформлении заданий, ошибки в написании уравнений химических реакций, ошибки в расчетах и ошибки в выводе формул.

Результаты исследований различных групп студентов показали, что на занятиях нужно использовать разно-уровневые самостоятельные задания для того, чтобы менее подготовленные студенты могли справиться с данным им заданием. Кроме того, в процессе их выполнения вырабатывается умение работать самостоятельно, умение адекватно оценивать свои знания самостоятельно и проводить самоконтроль при решении задач.

Список литературы

- 1. Енякова Т.М. Химия в алгоритмах. Мозырь: ООО ИД «Белый ветер», 2002, 40 с.
- 2. Цветков Л.А. Преподавание органической химии. М.: Просвещение, 1988. 287 с.
- 3. Савич Т.3. Развитие у учащихся умения самостоятельного пополнения знаний // Химия в школе, 1980, №1, С. 22-24.
- 4. Осогосток Д.Н. Индивидуальный подход в процессе самостоятельной работы // Химия в школе, 1980, №1, С. 39-43.

Литвинова Т.Н., Литвинова М.Г. ФГБОУ ВО КубГМУ, Краснодар tnl 2000@inbox.ru

Эволюция химического образования в системе медицинского

В статье представлен анализ изменений содержания, структуры, требований к результатам обучения химическим дисциплинам, методологических подходов к обучению, методики обучения, учебного плана. Указаны противоречия в системе химической подготовки будущих врачей.

Ключевые слова: медицинское образование, химические дисциплины, обучение студентов.

Litvinova T.N., Litvinova M.G.
FSBEI HE KubSMU of the Ministry of Health Care
of Russia
Krasnodar

Evolution of chemical education in medical training

The article presents analysis of changes in the subject matter, structure, requirements for the results of teaching chemical disciplines, methodological approaches to teaching, teaching methods, curriculum. The contradictions in the system of chemical training of future doctors are indicated.

Key words: medical education, chemical disciplines, training students.

В России фундаментальная естественнонаучная подготовка всегда служила опорой медицинского образования. Одной из первых на медицинском факультете Московского университета, была основана кафедра химии М.В. Ломоносовым, который считал, что «медик без довольного познания химии совершен быть не может» [7].

Химические курсы в медицинских вузах мало отличались от таковых в других высших учебных заведениях до 1982 года. С 1982 по 1986 год в медицинских вузах курсы химии были преобразованы в следующие дисциплины: «Бионеорганическая и биофизическая химия», «Биоорганическая и биологическая химия». Это соответственно отражало основные блоки содержания, усиливало профильность и акцентировало внимание обучаемых на биологическом и медицинском аспектах неорганической, органической, физической и коллоидной химии.

В учебном плане на изучение химических дисциплин для студентов лечебного и педиатрического факультетов выделялось 50 часов лекций и 114 часов лабораторных работ (бионеорганическая и биофизическая химия), 102 часа лекций и 152 часа лабораторных работ (биоорганическая и биологическая химия).

С 1987 года в медицинских вузах комплекс химических дисциплин составили курсы «Общая химии», «Биоорганическая химия», «Биологическая химия», а также выделены часы на самостоятельную работу студентов. В таблице представлен учебный план по этим дисциплинам.

Таблица. Учебный план по общей химии, биоорганической химии и биологической химии

Дисцип- лина	Факуль- тет	1987-1994			1995-2000				
		лекции	Ja6. pa6.	Самостоят.	Итог. контроль	лекции	Лаб. раб.	Самостоят.	Итог.кон- троль
Общая химия	леч.	36	54	26	экз.	38	96	62	экз. (II)
	пед.	36	54	26	экз.	40	100	40	экз. (II)
	стомат.	18	54	20	экз.	20	60	38	экз.(I)
Биоорга- ническая химия	леч	18	36	16	экз.	19	57	36	экз.
	пед.	18	36	16	экз.	20	60	41	экз.
	стомат.	18	36	14	экз.	20	40	28	экз.
Биологиче- ская химия	леч.	46	102	42	экз.	74	111	79	экз.
	пед.	46	102	42	экз.	76	114	84	экз.
	стомат.	32	108	40	экз.	59	120	73	экз.

С 2000 года медицинские вузы работали по ГОС ВПО, в соответствии с которым на общую химию (ОХ) выделялось 124 часа, из них

аудиторных 82 часа, на самостоятельную работу — 42 часа, на биоорганическую химию (БОХ) отводился всего 71 час, из которых аудиторных часов было всего 47, а на самостоятельную работу — 24.

С 2009 года началась активная модернизация высшего образования в России, в том числе медицинского. Был утвержден и постепенно введен в действие ФГОС ВПО третьего поколения для разных факультетов с ориентацией на реализацию компетентностной модели для интеграции российского образования в единое европейское образовательное пространство.

ФГОС ВПО затем был трансформирован во ФГОС ВО (3+) с сохранением классификации компетенций на общекультурные (ОК), общепрофессиональные (ОПК) и профессиональные (ПК). В стандартах третьего поколения для измерения трудоемкости подготовки используются зачетные единицы.

Параллельно с актуализацией и усовершенствованием структуры, содержания ФГОС ВО в России стали разрабатываться профессиональные стандарты для дальнейшего их сопряжения с образовательными.

В соответствии с ФГОС ВО в структуре учебных дисциплин нет разделения на общую и биоорганическую химию, есть единый предмет «Химия», на который выделено всего 72 часа аудиторных занятий, и 36 часов — на самостоятельную работу. На химию отводится всего 3 зачетные единицы, что автоматически отменяет итоговый контроль усвоения знаний и умений в виде экзамена. ФГОС ВО (3+) изменений, касающихся химии, в учебный план не внес.

Таким образом, изменения, касающиеся химического образования в структуре медицинского, характеризуются, с одной стороны, постоянным снижением аудиторного учебного времени на изучение химии, увеличением доли самостоятельной работы студентов, а с другой стороны — усилением отражения прикладного, медико-биологического аспекта химии, интеграции разных разделов химии, в частности, общей, биофизической и биоорганической химии.

Возникают противоречия между:

- уплотнением содержания учебного химического курса и возможностями его изучения в сжатые сроки с сокращенным количеством аудиторного учебного времени;
- значимостью фундаментальной химической подготовки в период активного развития молекулярной медицины и определенной ее недооценкой студентами первого курса, когда они находятся в состоянии адаптации к условиям обучения в вузе, к большому объему учебного материала по разным предметам, особенно, по анатомии.

Кроме того, на первом курсе студентам сложно понять, определить и оценить межпредметные связи химии с теми дисциплинами (теоретическими, клиническими), которые им только предстоит изучать.

Следует отметить и противоречие, возникающее между увеличением времени на самостоятельную работу студентов и неразвитыми у многих первокурсников навыками такой работы [1, 3].

К положительным факторам можно отнести возможность введения вариативных курсов, позволяющих расширить информационное и деятельностное поле химического компонента медицинского образования. Нами разработан вариативный курс «Физико-химические основы методов исследования в медицине» и внедрен в учебный процесс на всех факультетах университета.

Химия, изучаемая на первом курсе медицинского вуза, обеспечивает преемственную связь с довузовской подготовкой, и в то же время выполняет пропедевтическую функцию для биохимии.

На наш взгляд преемственная связь химии довузовского этапа и химии, изучаемой на первом курсе медицинского вуза, могла бы быть более прочной и эффективной, если бы не следующая противоречивая ситуация: обучение профильное, а государственный экзамен единый. Программа по химии для химико- или медико-биологического профиля должна учитывать потребности химического курса медицинского вуза. В настоящее время данная программа перегружена фактологическим материалом, многое из которого, особенно из блока неорганической химии, не востребовано в курсе химии для медиков.

Анализ учебных достижений по химии студентов в нашем университете показывает, что большинство студентов (\sim 50%) имеют рейтинг по химии 50-69 баллов при стабильно проходном балле ЕГЭ на лечебный и педиатрический факультеты, равном 240 [5].

Например, в 2019 году среди поступивших на педиатрический факультет с баллами ЕГЭ по химии 70-79 было 26,5%, а первокурсников с таким рейтингом стало всего 14,4%. ЕГЭ на 80-100 баллов сдали 17%, поступивших на педиатрический факультет, а по курсу химии такой рейтинг получили только 12% студентов. Базовый уровень (70-79 баллов) выявлен у 14,4%, а в интервале 70-100 баллов — у 29% будущих педиатров.

Мы считаем, что кроме указанных выше противоречий и проблем, замена экзамена и дифференцированной оценки выставлением «зачтено», снижает заинтересованность студентов в получении высоких результатов.

По нашему мнению, роль химического образования как источника объективных знаний о природе веществ и фактора формирования хи-

мической, как части общей культуры человека, научного мышления и мировоззрения, способного служить основой самоопределения личности в жизни, усилилась в период обострения глобальных проблем. Это предполагает серьезную модернизацию системы химической подготовки специалиста медицинского профиля не только с позиций единых стратегий и целей всеобщего образования, но и с учетом потенциальных возможностей химии как науки, а также специфики, особенностей и педагогической ценности химического образования в структуре медицинского [4].

В условиях ухудшения экологической, демографической обстановки и связанной с ними проблемы снижения показателей здоровья нации, повышается значимость системы здравоохранения и медицинского образования, что нашло отражение в тексте новой Конституции Российской Федерации. Химия, как базис для изучения других химических, биологических и медицинских дисциплин, играет важную роль, в понимании глобалистических, в том числе, химико-экологических проблем.

Модернизация химического образования в медицинском вузе, осуществляемая с позиций общих идей и стратегий развития образовательной системы России, в значительной степени зависит от пересмотра целей, содержания, структуры и процесса изучения всего комплекса химических дисциплин: химии, фундаментальной биохимии, клинической биохимии.

Интегративно-модульный подход (ИМП), развитием и внедрением которого мы занимаемся много лет, позволяет адаптировать содержание и структуру курса химии к изменяющимся условиям и современным требованиям. ИМП предполагает внутри- и межпредметную интеграцию содержания, оформление основных подсистем знаний в виде модулей и их дидактико-методическое обеспечение.

Инновационный характер медицинского образования с учетом современных требований и мировых тенденций с формированием системы непрерывного образования в качестве инструмента профессионального развития может быть обеспечен внедрением компетентностного подхода, направленного на формирование профессионально готового к самостоятельной врачебной практике специалиста, развитием вариативности образовательных программ с использованием новых образовательных технологий и т.д. [2].

Химический компонент высшего медицинского образования является не только его важнейшим звеном. Мы используем его как способ, как инструмент формирования универсальных, общепрофессиональных и профессиональных компетенций [6].

На основе компетентностного подхода нами уточнены понятия «Химические компетенции», «Химическая компетентность будущего врача».

Мы предлагаем в группе предметных химических компетенций выделять базовые общехимические компетенции, относящиеся к комплексу химических учебных предметов, а также специальные химические компетенции, которые позволяют студентам самостоятельно приобретать новые знания, умения по специальности, они непосредственно связаны с будущей профессиональной деятельностью [4].

Химическая компетентность будущего врача, по нашему мнению, это тот уровень химической образованности, который позволяет студенту медицинского вуза быть готовым и способным применять химические знания, умения и опыт в дальнейшей учебной и далее профессиональной деятельности в русле своей специальности [4].

По мере изменения целей обучения, содержания и структуры курса химии менялась и методика его изучения. Нами широко используются интерактивные, в том числе дистанционные, методы обучения, активная визуализация учебного материала, сочетание виртуального и реального эксперимента. Выделенные нами модули содержания курса химии «Основы общей химии» и «Основы биоорганической химии» имеют полное методическое обеспечение, доступ к которому обеспечен на портале дистанционного обучения нашего университета.

Таким образом, актуализированный ФГОС ВО определяет новые ориентиры для организации учебного процесса в медицинском вузе, который должен обеспечить подготовку компетентных специалистов медицинского профиля в русле гуманистической парадигмы, на основе современных методологических подходов — системного, деятельностного, компетентностного, личностно-ориентированного, контекстного и др.

Интегративно-модульный подход позволил нам разработать курс химии для студентов медицинского вуза, адаптируемый к меняющимся требованиям к подготовке специалистов в условиях активного развития медицинской науки, в частности молекулярной медицины, протеомики, геномики, к изменяющимся внешним, в частности, санитарно-эпидемическим условиям.

Список литературы

1. Вербицкий А. Самостоятельная работа студентов: проблемы и опыт [Текст] / А. Вербицкий // Высшее образование в России. — 1995. — №2. — С. 137-145.

- 2. Глыбочко П.В. Основные задачи развития медицинского и фармацевтического образования в ходе исполнения Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» / П.В. Глыбочко // Медицинское образование и вузовская наука. 2012. N1. C. 12-15.
- 3. Деревцова С.Н. Формирование обобщённых умений студентов при изучении предметов естественнонаучного цикла в медицинском вузе [Текст] / С.Н. Деревцова // Вестник Смоленской медицинской академии, 2009. №2. С. 17-18.
- 4. Литвинова Т.Н. Современный курс химии в медицинском вузе: цели, содержание, структура / Т.Н. Литвинова, М.Г. Литвинова // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 4; URL:http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27831 (дата обращения: 05.09.2020).
- 5. Литвинова Т.Н. Оценка результатов обучения химии студентов педиатрического факультета / Т.Н. Литвинова, М.Г. Литвинова // Естественнонаучное образование: стратегия, проблемы, достижения / Материалы региональной учебно-методической конференции с международным участием 27 марта 2019 г. Краснодар: ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, 2019. С. 187-189.
- 6. Литвинова Т.Н. Формирование химических компетенций студентов медицинского вуза путь к профессионализму / Т.Н. Литвинова // Современные педагогические технологии в преподавании предметов естественно-математического цикла: сборник научных трудов.— Ульяновск: УЛГПУ им. И.Н. Ульянова, 2017. С. 44-47.
- 7. Московский университет в воспоминаниях современников / Составитель Ю.Н. Емельянов, М., 1989. 735 с.

УДК 372.854:37.02:373.51

Лямин А.Н.

ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России, Киров lyamin.lyaminchemistry2015@yandex.ru

Демонстрационный эксперимент на лекционных занятиях по химии в медицинском университете

В данной статье рассмотрена методика использования демонстрационного интегративного эксперимента на лекционных занятиях по химии как эффективного дидактического средства успешного освоения студентами курса химии и активной мотивации студентов к получению профессии в медицинском университете.

Ключевые слова: демонстрационный интегративный химический эксперимент, стимуляционно-мотивирующая ситуация, интеграция естественнонаучных и гуманитарных знаний.

Lyamin A.N.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kirov State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation Kirov region, Kirov

Demonstration experiment at lecture classes in chemistry at a medical university

This article considers the methodology of using a demonstration integrative experiment in lecture classes in chemistry as an effective didactic means for students to successfully master a chemistry course and actively motivate students to gain a profession at a medical university.

Key words: demonstration integrative chemical experiment, stimulation-motivating situation, the integration of natural Sciences and Humanities.

Никаким количеством экспериментов нельзя доказать теорию; но достаточно одного эксперимента, чтобы её опровергнуть. Альберт Эйнштейн

В настоящее время учёные-методисты высшей школы отмечают у студентов низкий уровень мотивов изучения химии и, как следствие, затруднения в изучении и неудовлетворительные результаты освоения курса химии в организациях высшего профессионального образования (М. Пак, Г. Н. Фадеев, Е. В Береснева и др.). Также и в организациях высшего профессионального образования медицинского направления актуальна эта же проблема (Т. Н. Литвинова, А.Е. Щеголев и др.). Несмотря на то, что химия является базовой наукой для медицинских наук, студенты медицинских университетов не придают должного значения химии как фундаментальной основе изучения медицинских дисциплин и овладения будущей профессией врача, провизора, биохимика-аналитика и др.

Одним из наиболее эффективных, опираясь на опыт, методических средств решения обозначенной проблемы является активное использование в лекционном курсе по химии стимуляционно-мотивирующих ситуаций. Стимуляционно-мотивирующая ситуация — сознательно вызванное высокоэмоциональное состояние учащихся, детерминирующее личностно-ценностные смыслы удовлетворения

собственных желаний, потребностей, стремлений, направленные на достижение образовательных целей.

Структуру стимуляционно-мотивирующей ситуации можно представить в виде схемы (см. схему 1).



Схема 1

Пре имущество целенаправленного и системного использования в лекционном курсе по химии стимуляционно-мотивирующих ситуаций с использованием противоречий в отличие от традиционного системно-логического словесного изложения материала заключается в том, что в первом случае непосредственно на лекции в процессе учебной работы у студента естественным образом возникает проблема, а это, в свою очередь, ведёт к тому, что внутренняя мотивация студента по решению данной проблемы совпадает с целью лекции. «Особенно острую проблемность приобретает ситуация при обнаружении в ней противоречий. Наличие в проблемной ситуации противоречивых данных с необходимостью порождает процесс мышления, направленный на их «снятие» [1, С. 15]. В процессе осмысления противоречия у студентов актуализируются учебные действия по решению проблемы, которые являются результатом интеграции системных знаний и метапредметных умений.

Стимуляционно-мотивирующие ситуации не являются типовыми в традиционном смысле этого слова, а представляют собой модель жизненной ситуации, в решении которой студенты видят смысл, получаемого образования. Эти модели направлены на ознакомление учащихся с увеличивающейся техно-когнитивной и информацион-

ной экспансией человечества и пользой, которую она несёт. Таким образом, созданная стимуляционно-мотивирующая ситуация на лекционном занятии по химии актуализирует познавательную потребность, даёт направленность мысли и создаёт внутренние (личностно-значимые) условия (смыслы) для усвоения студентами учебного материала.

Отличительными особенностями таких ситуаций являются:

- ✓ реальный сюжет, объяснение которого требует использования системных знаний, интегративных умений и универсальных учебных действий, на которые нет явного указания;
- ✓ проблема, заключённая в скрытом виде, в ходе решения которой актуализируется учебная проблема, которая становится личностно значимой;
- ✓ нестандартность и противоречивость ситуации по сути обеспечивает эффект новизны и актуальности изучаемого материала;
- ✓ опора на жизненный опыт, знания, мнения, предпочтения учащихся; минимизирует формализм знаний, который порождается несовпадением и разрывом между житейскими представлениями и научными знаниями;
- ✓ избыточные, недостающие или парадоксальные данные предоставленные студенту приводят к формированию интегративных умений;
- ✓ открытость ситуации не предполагает эталона «правильности», напротив, стимулирует нахождение множества вариантов решений, при этом подавляется мотив избегания неудачи и активизируется мотив достижения, что снимает психологический барьер студента при выдвижении гипотезы, хотя уровень сложности проблемы может быть достаточно высоким;
- ✓ вариативная форма представления информации (реальный эксперимент, рисунок, таблица, схема, диаграмма, график и т.д.) требует умений кодировать и декодировать информацию;
- ✓ указание (явное или неявное) на возможность применения обеспечивает индивидуально-ценностный смысл и внутреннюю мотивацию студента изучения химии и получения профессии.

Методологическим основанием создания стимуляционно-мотивирующей ситуации является интеграция естественнонаучных и гуманитарных знаний — процесс и результат целостного объединения естественнонаучных и гуманитарных компонентов (содержания, форм, средств и методов, теории и практики образования), стимулирующий развитие культуры учащихся, понимание ими природы и значения человеческих ценностей в современном

мире, формирующий у студентов профессиональную компетентность как интегральное выражение образовательных компетенций, включающих: системные знания, интегративные умения, универсальные учебные действия, индивидуально ценностные смыслы, внутренние мотивы учения и опыт творческой деятельности, ценность самообразования, эмоции и отношения и другие качества культурного человека.

Одним из эффективных способов создания стимуляционно-мотивирующей ситуации на лекции по химии является демонстрационный интегративный эксперимент — аудиторное воспроизведение демонстратором (преподавателем, инженером, лаборантом) с помощью специального оборудования химического явления (использования этого явления на практике) на лекционном занятии в условиях, наиболее удобных для его изучения.

Педагогически обоснованная система использования демонстрационного интегративного эксперимента позволяет реализовать все функции обучения: воспитывающие (трудолюбие, эстетические чувства, здоровый образ жизни, бережное отношение к окружающим и к природной среде...); развивающие (интеллект, память, мышление, воображение, эмоции, мотивы изучения химии и получения профессии, самостоятельность...); обучающие (источник познания; метод познания химических объектов, метод решения учебных проблем, метод проверки гипотез; средство иллюстрации, исследования, достижения дидактических целей, доказательства истинности знаний; форма обучения химии...). Дидактической основой демонстрационного эксперимента является процесс и результат интеграции естественнонаучных и гуманитарных знаний, т.е. интеграция химической сущности явления (естественнонаучная составляющая) с техникой проведения эксперимента и со словесным сопровождением (гуманитарная составляющая) (см. схему 2).

В зависимости от соотнесения действия и слова можно обозначить пять дидактических форм постановки демонстрационного эксперимента [2, C. 154]:

1-я форма: перед проведением эксперимента со слов преподавателя студенты получают информацию о процессе, а затем наблюдают признаки, подтверждающие слова экспериментатора (иллюстративный характер);

2-я форма: перед проведением эксперимента со слов демонстратора студенты получают готовую информацию о непосредственно не воспринимаемых связях и отношениях, а затем в ходе эксперимента разъясняется его сущность (иллюстративный характер);

3-я форма: преподаватель по ходу демонстрации словом акцентирует внимание учащихся на признаках, а они, в свою очередь, из наблюдения делают выводы и усваивают знания (исследовательский характер);

4-я форма: демонстратор, акцентируя внимание учащихся на признаках, непосредственно не воспринимаемых в ходе наблюдения, ведёт их к осознанию интегративных связей и отношений (исследовательский характер);

5-я форма: демонстратор перед проведением эксперимента задаёт проблему, решение которой студенты находят в ходе анализа эксперимента и синтеза умозаключений о сущности процесса (проблемный характер).



Схема 2

Необходимые требования к демонстрационному интегративному химическому эксперименту: обозреваемость (хорошо видно всем); наглядность (правильность восприятия); выразительность (суть при минимуме затрат); безукоризненность и простота техники выполнения; надёжность (без срывов); эстетичность оформления; кратковременность; эмоциональность; доступность для понимания; убедительность (однозначность объяснения); оптимальность методики; безопасность для всех.

Пример демонстрационного интегративного эксперимента в лекционном курсе органической и физической химии по теме «Катализ, ферменты»; демонстрационный эксперимент «Каталитическое разложение пероксида водорода». В демонстрационные цилиндры объёмом 500 см³ приливают по 50 см³ водных растворов с массовой долей пероксида водорода 10 %. Растворы в цилиндрах бесцветны и прозрачны. Затем в первый цилиндр демонстратор вносит 1 см³ порошка диоксида марганца. Наблюдается вскипание раствора с образованием пены, что говорит о выделении газа. При внесении в цилиндр тлеющей лучинки она ярко вспыхивает, что позволяет сделать однозначный вывод — выделяющийся газ является кислородом, а диоксид марганца катализирует процесс разложения пероксида водорода с образованием кислорода и воды. Во второй цилиндр экспериментатор вносит несколько кристалликов перманганата калия. Раствор в цилиндре бурно вскипает и из цилиндра вырывается столб пара. Студенты отмечают большую реакционную активность и скорость процесса во втором цилиндре, объясняя факт окислительно-восстановительным взаимодействием пероксида водорода с перманганатом калия и автокаталитическим эффектом данного процесса:

В третий цилиндр демонстратор вносит несколько кристаллов иодида калия. Раствор в цилиндре окрашивается в бурый цвет и постепенно образуется плотная пена. Противоречие в понимании данного процесса заключается в том, что иодид калия в принципе не может окислять пероксид водорода, а наоборот пероксид водорода окисляет иодид до свободного иода, чем и обусловлена окраска раствора:

$$H_2O_2_{(p^-p)} + 2KI_{(TB)} = I_2_{(TB)_i\atop 6y_0bi\check{M}} + 2KOH_{(p^-p)}$$

но чем тогда обусловлено образование пены, если выделение кислорода невозможно? Решение противоречия заключается в каталитической активности иодид-анионов в параллельном процессе разложения пероксида водорода. В четвёртый цилиндр демонстратор добавляет кусочек сырого мяса с кровью. В цилиндре обильно образуется

столб плотной пены, поднимающий кусочек мяса. Студенты делают вывод о каталитической, а точнее ферментативной, активности крови и сырого мяса в реакции разложения пероксида водорода. Для сравнения можно предложить фактические данные занесённые в таблицу (табл. 1).

Таблина 1

Катализатор	Энергия активации, кДж/моль	Относительная скорость реакции при 25° С
без катализатора	73	1
ионы I—	56	1,1·103
каталаза	7	3·1011

В пятый цилиндр экспериментатор добавляет кусочек варёного мяса. Никаких признаков прохождения химической реакции не отмечается. Решением противоречия становится факт разрушения ферментов в биологических средах при нагревании. После проведения эксперимента преподаватель ставит ряд проблемных вопросов, например, чем обусловлено использование 3 % водного раствора пероксида водорода в качестве наружного антисептического средства? В каких случаях в быту можно использовать водный раствор пероксида водорода или раствор гидроперита — клатрата карбамида с пероксидом водорода? Рабочая гипотеза: фермент, содержащийся в крови, в частности каталаза, катализирует разложение пероксида водорода и при этом происходит обильное вспенивание; следовательно, раствор пероксида водорода можно использовать для обработки кровоточащих ран, при этом обильное вспенивание очищает рану, образующийся атомарный кислород дезинфицирует рану и способствует образованию тромба, останавливая тем самым кровотечение. В быту раствор пероксида водорода или раствор гидроперита можно использовать, например, для опрыскивания комнатных растений с целью борьбы с паразитами или дезинфекции ванных комнат и санузлов.

Вывод: посредством демонстрационного интегративного химического эксперимента на лекционных занятиях по химии преподаватель актуализирует противоречия и создаёт стимуляционно-мотивирующую ситуацию, инициируя тем самым мотивацию учения, познание и учебные действия студентов. Процесс осмысления такого эксперимента и выполнение заданий к нему требует от студентов интеллектуального напряжения, а разрешение проблемы вызывает у них

положительные эмоции и является активным мотиватором учения, следовательно, воспитывает ценностно-смысловое отношение к изучению химии и понимание учащимися значения химических знаний в дальнейшей профессиональной деятельности.

Список литературы

- 1. Рубинштейн, С. Л. О мышлении и путях его исследования [Текст] / С. Л. Рубинштейн. М.: Педагогика, 1958. 147 с.
- 2. Пак, М. С. Теория и методика обучения химии: Учебник. [Текст] / М. С. Пак 2-е изд., испр. и доп. СПб.: Издательство «Лань», 2017. 368 с.

УДК 577.1:61:378.1

Магомедова М.А., Арбуханова М.С., Газимагомедова М.М. Дагестанский государственный медицинский университет, Махачкала madi 1975@bk.ru

Проблемы изучения биохимии в медицинском вузе и пути их решения

В данной статье мы анализировали наш опыт преподавания биохимии на протяжения нескольких десятилетий и предлагаем методы его модернизации для более успешного усвоения обучающимися материала.

Ключевые слова: биохимия, обучение, педагог, личность, инновации, студент, интеграция.

Magomedova M.A., Arbuhanova M.S., Gazimagomedova M.M.

Dagestan State Medical University,

Makhachkala

Problems of studying biochemistry in a medical school and ways to solve them

This article analyzes the teaching of biochemistry at the DSMU for several decades and proposes methods for its modernization for a more successful assimilation of teaching materials.

Key words: biochemistry, training, teacher, personality, innovation, student.

Особенностью изучения биохимии в медицинском вузе является то, что этот предмет является фундаментальным ядром. Поэтому при изучении биохимии необходимо создать условия для реализации со-

вокупности методических средств в практике обучения с ориентацией на достижение планируемых результатов (личностных, метапредметных и предметных).

В процессе образования многое зависит от психолого-педагогических аспектов самым важным в процессе обучения является структура стартовой учебной ситуация, которая состоит из подготовленности преподавателя к конкретному педагогическому воздействию, подготовленности сознания обучаемого к соответствующему конкретному учебному действию и подготовленности к этим действиям объектных условий. Подготовленность преподавателя складывается из программы педагогического действия, средств предъявления учебной информации и средств управления действиями обучаемых. Подготовленность обучаемого состоит из: состояния его образованности, его познавательного интереса, мотива и цели действия. Подготовленность объектных условий содержит: объект учебного действия, состоящий из изучаемых объектов и явлений, изобразителей изучаемой информации, объектов и явлений, в которых проявляется изучаемая информация; средства учебного действия, состоящие из средств преобразования объектов и явлений и средств выбора изображений (вербальной) информации. Все три обозначенных компонента подготовленности существуют в единстве и представляют собой интеграционную целостность [1,2,4].

Высшая медицинская школа должна вооружить студентов-выпускников комплексом теоретических и клинических знаний, умений и навыков, помочь освоить высокие медицинские технологии, в чем важная роль принадлежит фундаментальной подготовке будущих врачей, значимой составляющей которой является биохимия. Медицинское образование должно быть ориентировано на воспитание не студента потребителя, а студента исследователя, который легко станет высококлассным врачом исследователем.

Однако, одной из основных проблем студентов младших курсов медицинских вузов является их низкая способность к усвоению фундаментальных дисциплин, по-видимому это связано с уровнем до вузовской подготовки, степенью активности учащихся.

Для обучения в медицинском вузе необходимы глубокие знания точных естественных наук, таких как химия, биология, биохимия, которые обеспечивают понимание материала последующих курсов. Химическая подготовка студентов играет социальную роль, т.к. изучение влияния алкоголя, табака, наркотиков на здоровье человека лежит в основе здорового образа жизни. Важность химического образования для студентов медиков обусловлена необходимость понимания существа биохимических процессов, протекающих в организ-

ме и их влияние на молекулярном уровне. Мы предлагаем внедрить профессиональные конкурсы педагогов — это инструмент совершенствования компетенций преподавателя. Привлечь студентов к работе студенческих кружках — для формирования навыков учебно-исследовательской работы. Далее необходимо разнообразить способ оценки индивидуальных достижений обучающихся. Внедрить вариативный цикл по клинической биохимии, чтобы облегчить усвоение студентами клинических дисциплин на старших курсах. Использовать информационно-коммуникационные технологии, традиционные и инновационные подходы к обучению для удовлетворения потребностей разных категорий, обучающихся; одаренных студентов, студентов с ограниченными возможностями здоровья [1,2,4].

Исходя из вышеизложенного хочется сказать, что основной целью изучения биохимии должно быть достижение совокупности результатов по федеральным государственным образовательным стандартам общего образования.

Специфика использования комплексов средств обучения, прежде всего, обусловлена характерам познавательной деятельности учащихся. На этапе первичного познания их использование будет преследовать цель обогащения восприятий и совершенствования методов доставки информации. На этапе перехода от чувственного познания к абстрактному мышлению задача комплексов средств обучения будет являться интенсификация мыслительной деятельности учащихся и создания оптимальных условий для формирования верных представлений, и понятий.

Список литературы

- 1. Апиш М.Н. Некоторые подходы к определению уровней интеграции в науке // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы современной педагогики и системы образования». Т. 1. Майкоп: Изд-во АТУ, 2004.-С. 20 24.
- 2. Байлук В. В. Воспитание и самовоспитание // Педагогическое образование в России, 2014. № 1. С. 156-159.
- 3. Валицкая А.П. Российское образование: модернизация и свободное развитие // Педагогика 2001-№1 С.3-7.
- 4. Магомедова М.А. Основные принципы и критерии управления качеством образования в ВУЗе / Магомедова М.А., Арбуханова М.С. Проблемы управления качеством подготовки специалистов в медицинском ВУЗе. Материалы 3-й республиканской учебно-методической конференции с международным участием г. Махачкала, 2018г. С. 172-176.

УДК 378:54

Михайлова Н.В.¹, Орлова И.А.¹,², Сямтомова О.В.¹
ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»¹,
ФГБОУ ВО РГПУ им. А.И. Герцена²,
Санкт-Петербург
mikhaylova_n_v@almazovcentre.ru, iaorlova 12@mail.ru,
s.olgavlad@yandex.ru

Особенности базовой подготовки студентов медицинского вуза в процессе изучения дисциплины «Химия»

В статье речь идет об особенностях подготовки студентов-первокурсников по дисциплине «Химия» в контексте компетентностной модели выпускника медицинского вуза.

Ключевые слова: профессиональные компетенции, особенности содержания дисциплины «Химия», информационно-образовательные условия подготовки будущего врача.

Mikhaylova N.V.¹, Orlova I.A.^{1,2}, Syamtomova O.V.¹
Almazov National Medical Research Centre¹,
The Herzen State Pedagogical University of Russia²,
Saint Petersburg

Features of basic training of students of a medical university in the process of studying the discipline «Chemistry»

The article deals with the peculiarities of training first-year students in the discipline «Chemistry» in the context of the competence model of a graduate of a medical university.

Key words: professional competencies, features of the content of the discipline «Chemistry», informational and educational conditions for the training of a future doctor.

Среди основных стратегических направлений обеспечения инновационного характера высшего образования, качественно нового уровня с учетом современных требований и мировых тенденций наиболее актуальными на сегодняшний день являются внедрение компетентностного подхода, развитие вариативности образовательных программ с использованием современных образовательных технологий [1]. Компетентностный подход выдвигает на первое место не информированность обучающегося, а умение ставить задачу, проектировать и оценивать новый опыт, рефлексию и контроль собственных действий [2].

Дисциплина «Химия» входит в базовую часть основной образовательной программы подготовки по направлению «Лечебное дело» (уровень специалитета), рассчитана на 72 аудиторных часа (из них 24 часа лекционных занятий). Важнейшей целью дисциплины является формирование и развитие системного естественно-научного представления о строении и превращении органических и неорганических веществ, лежащих в основе процессов жизнедеятельности и влияющих на эти процессы в непосредственной связи с биологическими функциями этих соединений.

Изучение дисциплины направлено на решение следующих задач:

- формирование системных знаний, необходимых студентам при рассмотрении физико-химической сущности и механизмов процессов, протекающих в организме человека на молекулярном уровне;
- формирование умений выполнять в необходимых случаях расчеты параметров этих процессов, что позволит более глубоко понять функции отдельных систем организма и организма в целом, а также его взаимодействие с окружающей средой;
- подготовка специалиста, обладающего достаточным уровнем знаний, умений, навыков и способного самостоятельно мыслить и с интересом относиться к научно-исследовательской работе.

Формирование *содержания* дисциплины осуществлялось в соответствии с картой компетенций основного блока основной образовательной программы подготовки специалиста по направлению «Лечебное дело».

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций:

- способность к абстрактному мышлению, анализу, синтезу (OK-1);
- готовность к использованию основных физико-химических, математических и иных естественно-научных понятий и методов при решении профессиональных задач (ОПК-7).

Студент должен знать:

- физико-химические аспекты важнейших биохимических процессов и различных видов балансов в организме и окружающей среде;
- методы идентификации основных классов неорганических и органических соединений и др.

Студент должен уметь:

 выполнять расчеты концентраций, доз содержания веществ в различных растворах и смесях, определять рН; использовать основные физико-химические, математические и естественно-научные понятия, термины при решении ситуационных и профессиональных задач, связанных с направленностью химических процессов, с оценкой возможных химических превращений, с количественными расчетами основных параметров химических реакций и др.

Рабочая программа дисциплины «Химия» предусматривает знакомство студентов с основами термодинамики, кинетики, коллигативными свойствами растворов, основными типами химических равновесий и процессов в живых системах (протолитические, окислительно-восстановительные, гетерогенные, лиганднообменные равновесия), основами химии поверхностей и коллоидной химии, роль дисперсных систем в жизнедеятельности организмов; основные законы и понятия биоорганической химии, реакционную способность углеводородов, биологически важные реакции моно-, поли- и гетерофункциональных органических соединений, биополимеры и их структурные компоненты. Студенты, овладевая основами общей химии и биоорганической химии, готовятся к успешному усвоению смежных и специальных дисциплин, и в первую очередь, биохимии, экологической фармакологии, токсикологии.

Технология компетентностного подхода к обучению обеспечивает *деятельностную направленность* образовательных стандартов и возможность операционального задания планируемых результатов обучения через систему образцов деятельности.

Решение задач медико-биологической и эколого-химической направленности способствуют формированию и развитию расчетных умений и навыков студентов-первокурсников, осознанному усвоению теоретического материала, формированию и становлению профессиональной компетентности.

Лабораторные работы, включающие, в том числе, опыты по моделированию механизма действия лекарственных препаратов, а также химический эксперимент, используемый в современной клинической лабораторной диагностике, объединены в три блока по темам: «Моно- и полифункциональные органические соединения», «Гетерофункциональные органические соединения».

Для эффективного усвоения учебного материала каждая лабораторная работа содержит материалы о медико-биологической роли ряда биоорганических соединений, вопросы и задания для актуализации знаний по соответствующим темам, вопросы и задания для самоконтроля обучающихся.

Использование инновационной развивающей среды вуза (современные библиотечный фонд Института медицинского образования, ТСО, программно-методическое сопровождение, материальное оснащение учебных лабораторий) также создает условия для реализации квазипрофессиональной деятельности студента и формирования у студентов профессиональных компетенций.

Таким образом, химическая подготовка будущих врачей базируется на современном содержании, определенном целями и задачами в соответствии с компетентностной моделью выпускника медвуза в условиях реализации ФГОС ВО нового поколения. Как показал наш опыт (с 2018 г.), актуализация дисциплины «Химия» способствует активизации учебно-познавательной, научно-исследовательской деятельности студентов-первокурсников, усилению их мотивации к освоению будущей профессией.

Список литературы

- 1. Хуторской, А.В. Методологические основания применения компетентностного подхода к проектированию образования / А.В. Хуторской // Высшее образование в России. 2017. № 12 (218). С. 85-91.
- 2. Профессиональный стандарт. Врач-лечебник (врач-терапевт участковый) // Утвержден приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 21 марта 2017 г. № 293н.

УДК 577.57-378.147

Спасенкова О.М., Кириллова Н.В., Ли А.О.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Особенности преподавания химико-биологических дисциплин на кафедре биохимии СПХФУ

В статье рассмотрены некоторые вопросы организации учебного процесса, самостоятельной и научно-исследовательской работы студентов на кафедре биохимии СПХФУ в ходе подготовки провизоров.

Ключевые слова: провизор, учебный процесс, самостоятельная работа, научно-исследовательская работа.

Spasenkova O.M., Kirillova N.V., Li A.O.

FSBTI «St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University» Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg

To biochemistry and biology teaching strategy in the Department of Biochemistry SPCPU

The article discusses some issues of the organization of the educational process, independent and research work of students in the Department of Biochemistry of St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University during the training of pharmacists.

Key words: pharmacist, educational process, independent work, research work.

В последние годы в фармацевтической отрасли происходят серьезные изменения: утверждена государственная стратегия развития фармацевтической промышленности. Изменение структуры отрасли, рост производственного и научного потенциала требует расширения спектра компетенций провизоров. [1] Оно нацелено на подготовку специалистов, способных к приобретению новых знаний, используемых в профессиональной деятельности для профилактики, улучшения и обеспечение здоровья населения. Компетентность и профессионализм — главные качества, позволяющие выпускнику вуза, занять достой положение в выбранной профессии. Эти качества должны сформироваться у студента в ходе его обучения. В связи с этим актуальность приобретают не только качество изучаемого дисциплинарного материала, но и методы его изложения, групповое и индивидуальное общение со студентами, работа в научном студенческом обществе (НСО), проведение учебно-методических и научных конференций.

На кафедре биохимии СПХФА обучаются студенты фармацевтического факультета, которые изучают следующие дисциплины: «Биология», «Основы молекулярной биологии», «Общая и медицинская паразитология», «Биологическая химия», «Биохимические методы анализа», «Биотрансформация лекарственных веществ». Биология и биологическая химия представляют собой базовые дисциплины для формирования будущих специалистов данного профиля. Их изучение формирует необходимые знания о принципах организации целостного живого организма и молекулярных основах его функционирования, устанавливает связь между молекулярной структурой и биологической функцией химических компонентов живых организмов.

Результаты работы на кафедре подтверждают, что только совместное применение, умелое комбинирование инновационных активных методов, технических средств обучения и традиционных форм обучения дают хороший практический эффект [2]. И на сегодняшний день лекции и практические занятия остаются важнейшими формами обучения в вузе. Успешно читаются лекции по биологии и биохимии с использованием мультимедийной техники в форме презентации, что активизирует учебную деятельность и интерес студентов к предмету. Закрепление практических навыков невозможно без проведения лабораторных занятий. Наряду с классической формой проведения практических занятий на кафедре используются современные методики: мини-конференции, доклады с презентациями по актуальным темам дисциплин. Лабораторные работы, выполняемые студентами, представлены в учебных пособиях и лабораторных практикумах, написанных преподавателями кафедры. Последние годы большое внимание уделяется самостоятельной работе студентов. В новых учебных планах самостоятельной работе отводится большое количество часов. В связи с этим коллективом кафедры издаются рабочие тетради по каждой дисциплине, позволяющие студентам осмыслить, усвоить и проверить свои знания по изучаемой теоретической теме. Преподаватель с помощью листов рабочей тетради может определить, на каком этапе обучения студент допустил ошибку и в процессе занятия исправить.

На кафедре биохимии в рамках НИРС работают студенты, выполняющие реферативные работы по современной тематике биохимии, а также студенты, ведущие экспериментальные исследования. Научно-исследовательская работа в рамках СНО проводиться не только по тематике кафедры, но и по совместным темам с кафедрой фармакологии. Такие совместные работы заканчиваются серьезными дипломными работами, которые является основанием для дальнейшей успешной профессиональной деятельности. Нередко желание работать в научном студенческом обществе студенты высказывают уже с первого курса, т.к. на кафедре биохимии ведется преподавание такой дисциплины, как биология. Преемственность двух дисциплин играет положительную роль в восприятии дисциплин химико-биологического профиля. Изучая общую биологию, основы молекулярной биологии, студенты проявляют интерес к химическому строению веществ и реакциям, которые лежат в основе биологических процессов.

По мнению преподавателей кафедры, интерес к научной работе студентов также порождают учебно-методические студенческие конференции, которые проводятся на кафедре биохимии на протяжении

последних пяти лет и вызывают у студентов большой интерес. Тематика кафедральных студенческих конференций актуальна и злободневна, она затрагивает многие проблемы молодых людей, которые студенты стараются решить в процессе изложения теоретического материала в своих докладах. В качестве примеров можно привести следующие темы прошедших учебно-методических конференций: «Влияние алкоголизма и наркомании на молодой организм», «Правильное питание-здоровье нации», «Болезни цивилизации» и др. Подобные конференции выполняют важные функции: они воспитывают студентов, формируют их правильное мировоззрение, позволяют избежать пагубных привычек, ориентируют на здоровый образ жизни.

В заключении можно сказать, что дисциплины, изучаемые на кафедре биохимии и методы, применяемые в учебном процессе в ходе обучения, позволяют студентам овладевать умениями и навыками, развивать творческие и коммуникативные способности, заниматься научно-исследовательской работой, что очень важно в дальнейшей профессиональной работе.

Список литературы

- 1. Голикова Н.С., Тарасов В.В., Краснюк И.И., Савосина Е.Ф. Тенденции развития высшего фармацевтического образования // Высшее образование в России. 2016. № 2. С. 28-37.
- 2. Кириллова Н.В., Спасенкова О.М. Современные подходы активизации учебной деятельности студентов на фармацевтическом факультете СПХФА: сборник тезисов общероссийской конференции с международным участием «Медицинское образование 2013». М.: Общество персонализированной медицины, 2013. С. 224-226.

УДК 615.03(071)

Терских А.П., Алехина М.И.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Воронеж anastasia-prosvetova@vandex.ru, aloykhinamarv@mail.ru

Использование заданий с повышающимся уровнем сложности при проведении контрольных занятий по фармацевтической химии

Представлена информация о накопленном опыте использования заданий с повышающимся уровнем сложности при проведении контрольных

и итоговых занятий по дисциплине «Фармацевтическая химия» на фармацевтическом факультете ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, выявлены положительные и отрицательные стороны предложенной формы контроля.

Ключевые слова: фармацевтическая химия, структурированные задания, педагогический опыт.

Terskikh A.P., Alyokhina M.I.

Voronezh state medical University named after N. N. Burdenko of the Ministry of health of the Russian Federation, Voronezh

The using of tasks with increasing level of difficulty to realisation rating works for pharmaceutical chemistry

Information is provided on the accumulated experience of using tasks with increasing level of difficulty to realization rating works for the discipline «Pharmaceutical chemistry» at the pharmaceutical department of Voronezh State Medical University named by N. N. Burdenko, positive and negative aspects of such tasks are revealed.

Key words: pharmaceutical chemistry, structured tasks, teaching experience.

Фармацевтический факультет ВГМУ им. Н.Н. Бурденко был организован в 2002 году. В том же году на новую на тот период времени для Воронежской медицинской академии специальность был набран первый контингент студентов — будущих провизоров [1]. Перед профессорско-преподавательским составом возникла важная задача: в короткие сроки разработать учебно-методические комплексы по всем преподаваемым дисциплинам, что позволило бы обучить и воспитать специалистов высокого класса, способных конкурировать со своими коллегами из других ВУЗов как по уровню практических навыков и умений, так и по уровню теоретической подготовки.

Целью работы является рассмотрение накопленного опыта проведения контрольных и итоговых занятий, выявление положительных и отрицательных стороны предлагаемой формы их проведения.

Цель достигалась решением следующих задач:

- описать предлагаемую форму контрольного занятия;
- обосновать выбранную форму проведения контрольного занятия:
- выявить положительные стороны предлагаемой структуры.

Структура итогового занятия.

Коллоквиум состоит из трех частей, при этом каждая часть отличается от предыдущей уровнем сложности и, соответственно,

значением коэффициента, с учетом которого вычисляется конечный балл за контрольное занятие. Первое задание имеет самый низкий коэффициент равный 0,1. Как правило, в роли первого задания выступает тест с количеством тестовых заданий не менее 15, но и не более 25. На выполнение этого задания отводится от 15 до 20 минут. Первое задание выполняет разминочную функцию, способствует концентрации внимания и активации мыслительных процессов.

Второе задание имеет коэффициент равный 0,3. Шаблон задания состоит из двух частей. Первая часть включает в себя структурную формулу препарата, для которой обучающийся должен привести международное непатентованное и химическое названия лекарственного средства, физические свойства (цвет, запах, растворимость в различных растворителях), возможные примеси, испытания на чистоту, факторы, влияющие на доброкачественность (стабильность), условия хранения, показания к применению, лекарственные формы, возможные торговые названия.

Вторая часть оформлена в виде таблицы с перечисленными в ней возможными структурными элементами лекарственных веществ (функциональные группы, радикалы). Обучающийся, ориентируясь на структурную формулу препарата из первой части задания, выделяет из списка функциональные группы и радикалы, лежащие в основе лекарственного препарата. Кроме того, для выделенных структурных элементов лекарственного препарата обучающийся должен указать методики, позволяющие идентифицировать препарат (уравнения реакций, условия, открывающие реактивы, ожидаемый эффект реакции), а также методы количественного определения с указанием условий выполнения методик, типа титрующего раствора, способов фиксирования точки эквивалентности, способов расчета концентрации лекарственного препарата.

На выполнение этого задания выделяется от 30 до 40 минут времени.

Существует возможность проведения подобного вида контроля знаний обучающихся как в офлайн формате, так и с использование возможностей электронной образовательной системы Moodle.

Третье задание имеет самый высокий уровень сложности, и, соответственно, самый высокий коэффициент в конечном балле, а именно 0,6. На его выполнение отводится не менее 60 минут из трехчасового аудиторно-практического занятия. Суть задания заключается в необходимости внесения в бланк ответа полной информации по фармацевтическому анализу двух предложенных лекарственных

средств. Для получения максимального балла за это задание студент должен привести структурные формулы препаратов, «раскрыть» их по функциональным группам, указать фармакопейные и специфические реакции идентификации, а также описать фармакопейные методы количественного определения и предложить возможные методы, исходя из формирующих препарат функциональных групп. Наличие уравнений реакций для каждой из предложенных качественных и количественных методик анализа является обязательным. Помимо выше указанного, обучающийся должен рассчитать ожидаемый объем титранта для всех титриметрических методов количественного определения, не забыв указать формулу расчета концентрации лекарственного вещества.

Такая форма контрольного занятия по фармакопейному анализу органических лекарственных средств позволяет определить уровень усвоения пройденного материала, выявить наиболее затруднительные моменты при изучении фармакопейного анализа органических лекарственных средств, а также воспитать квалифицированного провизора-аналитика. Данная форма заданий включает различные компоненты:

- содержательный: в своей деятельности студент опирается на знания, полученные на практических занятиях и лекциях.
- операционно-деятельностный: студенты поэтапно получают задания различной степени тяжести и выполняют их на оценку.
- контрольно-регулировочный: выполнение каждого задания может оцениваться в процессе занятия и в случае возникновения сомнений в полноте знаний в последующем задании можно вернуться к нужной теме.
- эмоционально-волевой: каждое последующее задание сложней и объемней предыдущего, требует повышения сосредоточенности и высокой степени концентрации.
- оценочно-результативный: по итогам выполнения всех трех заданий выставляется суммарная рейтинговая оценка.

Предлагаемая система содержит ряд несомненных достоинств: задания расположены с нарастанием тяжести, что способствует концентрации; каждое задание охватывает свой участок знаний, что позволяет по результатам всех заданий составить целостное представление об обширности и глубине знаний студентов; каждое задание оценивается отдельно с учетом коэффициента, что позволяет сформировать адекватную рейтинговую оценку; второе задание структурно основано на фармакопейной статье, что не только облегчает

воспроизведение необходимой информации, но и готовит к третьему заданию, в котором студент должен самостоятельно предложить полную характеристику двух лекарственных средств. В качестве недостатка предложенной формы контроля можно назвать большой объем работы, выполняемый как студентом, так и преподавателем.

Список литературы

1. История факультета [Электронный ресурс] // Воронежский государственный университет им. Н.Н. Бурденко. URL: http://vrngmu. ru/academy/structure/farmatsevticheskiy-fakultet/1525/ (дата обращения 10.09.2020).

УДК 37.013.32

Тучик Е.С., Иваненко Т.А., Шведов С.Н.

ФГБУ Российский центр судебно-медицинской экспертизы МР, ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова МЗ РФ. Москва

Особенности образования с помощью дистанционного метода

Как показали события последнего времени образование может проходить в разных форматах, но его качество должно быть неизменно высоким. В данной статье описан разработанный нами метод дистанционного образования, который позволяет создать условия повышающие качество образования на расстоянии.

Ключевые слова: дистаниионное образование, метод, знания, образование, педагогика.

Tuchik E.S., Ivanenko T.A., Shvedov S.N.

The Russian centre is judicial-medical examination of Mr, Moscow state medical and dental University named after A. I. Evdokimov, Ministry of health of the Russian Federation, Moscow

Features of education using the remote method

As recent events have shown, education can take place in different formats, but its quality must be consistently high. This article describes the method of distance education developed by us that allows you to create conditions that improve the quality of education at a distance.

Key words: distance education, method, knowledge, education, pedagogy.

На сегодняшний день дистанционное обучение есть во многих учебных заведениях различного уровня в России и за рубежом. Это привычно и для многих студентов, которые рассматривают данную форму обучения как альтернативу обычной не только при получении второго образования, но и первого высшего образования [2]. Дистанционное обучение понимается как новая конфигурация обучения, которую при необходимости можно и нужно применять [4]. Известно, что информационно-образовательная среда представляет собой системно-организованную совокупность средств передачи данных, информационных ресурсов, протоколов взаимодействия, аппаратно-программного и организационно-методического обеспечения, ориентированную на получение профессиональных знаний [1]. Так же обучение при наличии пространственной или временной удаленности, закономерно проходит и с помощью средств телекоммуникаций, при котором студенты и преподаватели осуществляют общий учебный процесс [3]. Поэтому важным и актуальным является разработка грамотной технологии обучения для условий, при которых студент и преподаватель территориально находятся в разных местах.

Так в связи с внедрением дистанционного образования и наш учебный процесс, на кафедре медицинской реабилитации МГМСУ им. А.И. Евдокимова был разработан метод образования, позволяющий доступно донести информацию о данной специальности до студентов из поставленных условий.

Учебный процесс был построен исходя из утвержденной программы по специальности, с аналогичными модулями и количеством часов, однако практические занятия и лекции велись дистанционно. Для контроля мы использовали индивидуальный письменный опрос, написание истории болезни, практическую проверку усвоения знаний в виде составления программ реабилитации при разных патологиях и тестирования. Для изучения тем мы использовали следующие формы подачи знаний: лекции и практические занятия в виде ознакомления с видео-лекциями, лекциями-презентациями, практическими навыками с помощью видеороликов, а также бесед, объяснений, ответов на вопросы, детального разбора письменных домашних заданий, самостоятельной работы с учебником, ознакомления с методическими пособиями и видеороликами на YouTube.

Для повышения эффективности преподавания предмета для лучшего восприятия информации текст лекций и сообщений исходя их смысла был набран шрифтом разной величины, разными цветами, части предложений или по несколько предложений выделялись разными цветами, подчеркивались, что позволило студентам при чтении осознавать текст целиком, не упуская какой-либо его детали.

Помня, что одной из основных задач по подготовки будущих специалистов в медицинском вузе является формирование практических умений и навыков будущего врача, исходя из тем занятий нами были предложены видеоролики на практические манипуляции и занятия с пациентами средствами медицинской реабилитации по различным методам, при разных патологиях, применяемых в разных странах для лечения в медицинских учреждениях, а также учебные мастер-классы по разным методам. Исходя из задач других медицинских специальностей суть ссылок на обучающие практические навыки и исследования, а также видеоконференции может быть различной в зависимости от целей и задач, которые перед собой ставит преподаватель. Это обеспечивает обучение трудовым функциям врачей-специалистов исходя из созданных условий дистанционного образования, которые позволят им осуществлять самостоятельную деятельность в будущем.

Помимо текстовых и видео лекций, мы использовали презентации, где были проанализированы знания по этиологии, патогенезу, характеру клинического течения, эволюции, прогнозу заболеваний с изложением принципов лечения средствами медицинской реабилитации, а также методически изложена поэтапная суть методов лечения, оформления истории болезни, проведение дифференциального диагноза и др.

Таким образом разработанный метод дистанционного образования на кафедре медицинской реабилитации одного из ведущих вузов страны МГМСУ им. А.И. Евдокимова позволяет создать условия для обеспечения обучения в вынужденных условиях удаленного образования, и показывает студентам новые пути познания медицинской науки, на основе примера высокого качества медицинской помощи, что даст возможность будущим врачам, а в настоящем студентам медицинского вуза совершенствоваться и в дальнейшем, быть в курсе новейших достижений медицинской науки и при желании пользуясь данным опытом поддерживать свой профессиональный уровень на протяжении всей своей врачебной деятельности.

Список литературы

- 1. Ибрагимов И. М. Информационные технологии и средства дистанционного обучения: Учеб. пособие для студентов высших учебных заведений / Под ред. А. Н. Ковшова. М.: Издательский центр «Академия», 2005
- 2. Кузнецова О.В. Дистанционное обучение: за и против // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. $2015. \mathbb{N} \ 8-2. \mathbb{C}.\ 362-364$
- 3. Полат Е. С., Бухаркина М. Ю., Моисеева М. В. Теория и практика дистанционного обучения: Учеб. пособие для студентов высших педагогических учебных заведений / Под ред. Е. С. Полат. М.: Издательский центр «Академия», 2004.
- 4. Тихомиров В.П. Основные принципы построения системы дистанционного образования России // Дистанционное образование. 1998. № 1. С. 4-9

УДК 577.121

Яроватая М.А., Таканаев А.А., Юшкова Е.И. ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

Россия, Орел

 $may a 0330 @ mail.ru, \ chemistry.med @ yandex.ru, \ elen_yushkova @ mail.ru$

Особенности реализации образовательной программы по биохимии в медицинском вузе в условиях дистанционного обучения

Пандемия COVID 19 не обошла стороной и высшее медицинское образование. Студентам и преподавателям пришлось перейти на дистанционное обучение. Реализация части образовательной программы по биохимии осуществлялась онлайн. Были созданы и проведены занятия-видеоконференции с помощью системы конференций Zoom.

Ключевые слова: высшее медицинское образование, биохимия, дистанционное обучение.

Yarovataya M.A., Takanaev A.A., Yushkova E.I. FSBEI HE "Orel State University named after I.S. Turgenev" Russia, Orel

Features of implementing an educational program in biochemistry at a medical University in the context of distance learning

The COVID 19 pandemic has not spared higher medical education. Students and teachers had to switch to distance learning. The implementation part of the

educational program in biochemistry was carried out online. Video conferencing sessions were created and conducted using the Zoom conference system.

Key words: higher medical education, biochemistry, distance learning.

Меняются цели и задачи, стоящие перед образованием, происходит перенос с усвоения знаний на формирование компетентности. Изменяется понимание «фундаментализации» образования. Это способствует внедрению новых педагогических технологий в образовательный процесс отечественной школы. В современное образование активно внедряются информационные технологии [1].

Востребованность дистанционного обучения уже сейчас в мире достаточно высока. Необходимость дистанционного обучения в нынешних условиях не вызывает сомнений. В этом мы убедились в период пандемии COVID-19 на собственном опыте. Эта востребованность будет с годами расти, поскольку все больше людей желают получить полноценное образование или углубить свои знания по отдельным предметам, не имея возможности учиться на очных отделениях или будучи неудовлетворенными качеством образования на местном уровне, или в силу сложившихся обстоятельств, которые невозможно изменить.

Внедрение дистанционного обучения в учебный процесс образовательной организации — одна из самых актуальных педагогических тем, обсуждаемых в ряду инноваций, которые затрагивают систему образования. Руководители учебных заведений всех уровней (школы, техникумы, вузы) посредством дистанционного обучения хотели бы решить проблему привлечения дополнительного контингента обучающихся, снизить затраты на образовательный процесс, повысить качество обучения, внедрить современные интерактивные технологии, поднять имидж своей организации. Безусловно, все это возможно при грамотном организационном подходе, но далеко не всегда удается сразу создать качественную систему обучения «на удалёнке», удовлетворяющую запросам администрации, преподавателей, обучающихся, родителей, контролирующих органов.

В условиях дистанционного обучения в нынешнем году на время пандемии оказалось и высшее медицинское образование. Завершать учебный год преподаватели и студенты-медики были вынуждены онлайн.

Дисциплина «Биохимия», «Биологическая химия», «Биологическая химия, биохимия полости рта» включена в базовую часть программы ФГОС ВО по специальностям «Лечебное дело», «Педиатрия», «Фармация», «Стоматология», является базовой в медицинском об-

разовании для медико-биологических, профессиональных и специальных дисциплин.

Основной задачей дисциплины можно назвать формирование общепрофессиональных компетенций у студентов медицинских специальностей. Обучающиеся должны: знать: основы структурной организации и функционирования основных биомакромолекул клетки, метаболизм и механизмы межмолекулярного взаимодействия; основы биохимических процессов, происходящих в различных тканях, с учетом морфофункциональных особенностей, физиологических состояний и патологических процессов в организме человека; уметь: использовать знания о строении биологических соединений и молекулярных процессах, в которых принимают участие биомакромолекулы; использовать знания о биохимических процессах в разных тканях организма человека в норме и патологии; владеть: основами физико-химических и химических методов анализа для исследования биологических объектов; навыками интерпретации биохимических показателей физиологических состояний и патологических процессов в организме человека.

Программа дисциплины предполагает изучение фундаментальных вопросов современной биохимии. Объем дисциплины составляет 216 часов (6 зачетных единиц). Биохимия осваивается студентами на 1, 2 и 3 курсе (в зависимости от специальности). Были проведены 2-часовые лекционные и 4-часовые лабораторные занятия с использованием образовательной платформы Zoom. Общение студентов и преподавателей происходило через личный кабинет на сайте университета. Занятия проводились по расписанию, с которым обучающиеся были заранее ознакомлены. Студенты получили полное представление об организации и функционировании основных биомакромолекул клетки, магистральных путях метаболизма веществ в организме человека, сведения о молекулярных механизмах ряда заболеваний, принципах биохимического анализа и диагностики заболеваний, научились решать задачи [4, 5].

Особая роль в усвоении программы дисциплины «Биохимия» всегда отводилась лабораторному практикуму. Это и стало самым острым вопросом при реализации программы по биохимии в дистанционном формате, так как выполнение лабораторных опытов вне биохимической лаборатории, при отсутствии оборудования и реактивов, студентам самостоятельно не представлялось возможным. Эксперимент выполнялся и демонстрировался преподавателем при помощи видеосвязи в специализированной лаборатории. Лабораторные работы подбирались таким образом, чтобы теорети-

ческие знания студенты непосредственно подтверждали на практике. Предлагались лабораторные журналы-практикумы, в которых представлены требования к технике безопасности при работе в лаборатории, при эксплуатации оборудования, приведены методики проведения лабораторных работ, рассчитанных на 4-часовые занятия, представлены нормальные биохимические показатели организма [3]. Обучающиеся после демонстрации эксперимента оформляли свои журналы, защищали лабораторные работы. Следует отметить, что именно эти занятия в лаборатории с огромным неподдельным интересом посещали иностранные обучающиеся. На дистанционные занятия студенты приходили подготовленные, с конспектами лекций, с выполненным домашним заданием, теоретически подготовленной лабораторной работой. Студенты всегда задавали вопросы, если им какой-то материал был непонятен. Для закрепления материала на каждом занятии успешно выполняли тестовые задания [2].

Например, для студентов 2 курса специальности «Фармация» и студентов 1 курса специальности «Стоматология» большая часть лабораторных занятий по биохимии (февраль-март) была проведена в обычном режиме, в учебной лаборатории, но несколько занятий прошли онлайн.

У студентов данных специальностей дисциплина изучается в двух учебных семестрах, но с длительным перерывом на летние каникулы. Никакой промежуточной аттестации по биохимии в весеннем семестре, к сожалению, не предусмотрено [6, 7]. Студенты-провизоры и студенты-стоматологи осваивали такие разделы биохимии как «Биологические мембраны», «Энергетический обмен», «Обмен углеводов», «Обмен липидов» в дистанционном формате. В силу сложившихся обстоятельств выполняли Модуль 2 по данным темам онлайн. Мы проанализировали результаты успеваемости студентов по модулю 2, который обучающиеся выполняли традиционно в аудитории в 2018-2019 учебном году, и сравнили с полученными результатами в текущем учебном году при написании модуля онлайн. Анализ результатов модуля 2 «Биологические мембраны. Энерге-

Анализ результатов модуля 2 «Биологические мембраны. Энергетический обмен. Обмен углеводов» студентов специальности «Фармация» показал, что в период дистанционного обучения все студенты усвоили материал: «неудовлетворительных оценок» нет, напротив, при написании модуля традиционно — 25% «неудовлетворительно» сдали модуль. Но следует отметить, что 25% студентов выполнили модуль на «отлично» аудиторно, а при дистанционном онлайн обучении всего один студент получил отличную оценку.

Таблица 1. Результаты успеваемости по модулю 2 группы студентов специальности «Фармация» в 2018-2019 и 2019-2020 учебных годах

Успеваемость студентов	2018-2019 уч. год (аудиторный модуль)		2019-2020 уч. год (модуль онлайн)	
	количество	%	количество	%
«ОТЛИЧНО»	4	25	1	17
«хорошо»	5	31	7	44
«удовлетворительно»	3	19	8	50
«неудовлетворительно»	4	25	-	-
«не явились»	-	-	-	-
Всего	16	100	16	100

Таблица 2. Результаты успеваемости по модулю 2 группы студентов специальности «Стоматология» в 2018-2019 и 2019-2020 учебных годах

Успеваемость студентов	2018-2019 уч. год (аудиторный модуль)		2019-2020 уч. год (модуль онлайн)	
	количество	%	количество	%
«ОТЛИЧНО»	2	8	-	-
«хорошо»	6	24	4	16
«удовлетворительно»	11	44	18	72
«неудовлетворительно»	4	16	3	12
«не явились»	2	8	-	-
Всего	25	100	25	100

Результаты успеваемости по модулю 2 группы студентов специальности «Стоматология» оказались ниже, чем студентов-провизоров. Большинство обучающихся и аудиторно (44%), и онлайн (72%) получили оценку «удовлетворительно». В текущем учебном году (дистанционно) ни один студент не справился с модулем на «отлично», а также 12% обучающихся не выполнили модуль, получив оценку «неудовлетворительно». Скорее всего, нужно учитывать и тот момент, что студенты-стоматологи изучают биохимию на первом курсе медицинского вуза, в отличие от студентов-провизоров, которые знакомятся с этой медико-биологической дисциплиной на втором курсе мединститута.

Итак, анализируя результаты модуля по биохимии двух групп медицинских специальностей в онлайн условиях, пришли к выводу, что трудности выполнения заданий модуля касались именно практической части лабораторного практикума, который студенты смогли самостоятельно выполнить только теоретически в условиях дистанционного обучения. Тем не менее, большая часть обучающихся справилась с заданиями, хотя отличных знаний студенты на дистанционном обучении получить не смогли. Но, несмотря на это, уровень знаний студентов, получавших знания традиционно, при тесном общении студента с преподавателем, студентов между собой в группе, оказался выше, чем при дистанционных занятиях.

Таким образом, использовать онлайн обучение студентов медико-биологическим дисциплинам в медицинских вузах частично возможно. Но, нужно отметить, что при всех плюсах дистанционного обучения, оно не может быть единственным способом реализации образовательной программы по биохимии в медицинских вузах. При получении качественных знаний, умений и навыков обучающихся, сформированных компетенций по биохимии должны использоваться традиционные формы обучения. Наверное, основной задачей образования было, есть и будет формирование гармонично развивающийся личности, признание человека главной социальной ценностью. Поэтому, каким бы необходимым не было дистанционное образование, переводить полностью на дистанционное обучение наше российское медицинское образование нельзя. Ничто не заменит личного «живого» общения студента и преподавателя, коллег и студентов между собой.

В дальнейшей работе мы постараемся учесть все ошибки и замечания, чтобы повысить уровень образования студентов медицинских специальностей, для получения наиболее эффективных результатов работы.

Список литературы

- 1. Образцов П. И. Проектирование и конструирование профессионально-ориентированной технологии обучения: Учебно-методическое пособие / Под ред. Профессора П.И. Образцова / Орел: ОГУ, 2003.-94 с.
- 2. Таканаев А.А, Яроватая М.А., Горецкая Т.И. Тестовые задания для самостоятельной работы студентов по биохимии. Орел: ГОУ ВПО «ОГУ». 2008. С. 92.

- 3. Яроватая М. А. Лушников А. В. Лабораторный практикум по биохимии в медицинском вузе // Российско-Украинская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы химии и методики ее преподавания», Нижний Новгород, 18 ноября 2010 г.— С. 108—111
- 4. Яроватая М.А., Таканаев А.А, Лушников А.В. Разработка и внедрение разноуровневых заданий в фонд оценочных средств по биологической химии в рамках ФГОС ВПО// Сборник научных трудов 61 Всероссийской научно-практической конференции химиков с международным участием «Актуальные проблемы химического и экологического образования», г. С-Петербург, 16-19 апреля 2014 г., с. 233-235
- 5. Яроватая М.А., Королева И.П., Лазарева Е.К. Тестирование как форма контроля знаний по биохимии для иностранных студентов в медицинском вузе// Сборник по мат. III Международной научнопрактической конференции «Инновационные процессы в области естественнонаучного и социально-гуманитарного образования», Оренбург, 17-18 марта 2016 г., с. 308-311
- 6. Яроватая М. А., Королева И. П., Лазарева Е. К. Результаты обучения студентов медицинского института специальности «Фармация» по «Биологической химии» в рамках ФГОС третьего поколения// «Инновации в образовании», Краснодар, 27 марта 2015г., Международный журнал экспериментального образования, №4, 2015г., с. 289-292.
- 7. Яроватая М. А., Королева И. П., Лазарева Е. К. Лекция-конференция как форма контактной работы по «Биологической химии, биохимии полости рта» со студентами медицинского института// Сборник научных трудов 66 Всероссийской научно-практической конференции химиков с международным участием «Актуальные проблемыхимического и экологического образования», Санкт-Петербург, 18—20 апреля 2019. С.236—240 с.

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ХИМИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ»

Санкт-Петербург 3 декабря 2020 года

Под редакцией А. В. Силина, Л. Б. Гайковой

Часть 2

Технический редактор T.H. Ефимова Подписано в печать 25.11.2020 г. Формат бумаги 60×84/16. Уч.-изд. л. 15,15. Усл. печ. л. 19,5. Тираж 50 экз. Заказ № 230(2).

Санкт-Петербург, Издательство СЗГМУ им. И. И. Мечникова 191015, Санкт-Петербург, Кирочная ул., д. 41.

Отпечатано в типографии СЗГМУ им. И. И. Мечникова 191015, Санкт-Петербург, Кирочная ул., д. 41.