



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 1



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

IL Werfen



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
- Системы взятия капиллярной крови Microvette
- Контейнеры для биологических образцов
- Пробирки
- Расходные материалы для: бактериологии, ПЦР-диагностики, культивирования клеток
- 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



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 30%
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 1

**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. 1. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2020. – 364 с.

ISBN 978-5-89588-119-4

Ч. 1. 978-5-89588-120-0

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

Ч. 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

Становление кафедры биологической и общей химии им. В.В. Соколовского.....	11
<i>д.м.н., проф., проректор по науке и инновационной деятельности Силин А.В., д.м.н., заведующий кафедрой биологической и общей химии им. В.В. Соколовского Гайковая Л.Б.</i>	
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ХИМИИ ПРИРОДНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, А ТАКЖЕ ПРИМЕНЕНИЕ ХИМИИ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ.....	17
<i>Абдужампарова Н.Э.</i>	
Ядовитые химикаты, снижающие IQ у детей	17
<i>Акуневич А. А.</i>	
Оценка межмолекулярных взаимодействий между факторами роста эмбриональной бычьей сыворотки и рецептором эпидермального фактора роста культуры клеток HeLa	19
<i>Астафьева О.В., Генатуллина Г.Н., Жаркова З.В., Ясенявская А.Л., Арнаудова К.Ш., Якимец М.В., Самотруева М.А.</i>	
Тысячелистник мелкоцветковый как источник биологически активных веществ с противомикробной активностью	25
<i>Беляев А.П., Мохоров Д.А.</i>	
Повышение объективности анализа в аналитической химии	31
<i>Васильева Н.Г., Козлова-Козыревская А.Л., Мицкевич Е.Н.</i>	
β , β' -Трикарбонильный фрагмент как синтон лекарственных препаратов	42
<i>Васильева П.А., Дмитриева И.Б., Чухно А.С.</i>	
Исследование поверхностно-активных веществ, гидрофильно- липофильного баланса и критической концентрации мицеллообразования	45
<i>Горбацевич Г.И., Шадыро О.И.</i>	
Антиоксидантная активность сухих экстрактов растений рода <i>Galium</i>	51
<i>Городец М.Г., Абдуллина М.И., Бычкова А.В., Дегтярев Е.Н., Мотякин М.В., Коварский А.Л.</i>	
Оценка генерации АФК под действием магнитных наночастиц и пероксида водорода	57

<i>Дадали В.А., Соколова Е.А., Степанова Н.П., Власова Е.А., Сенатуллова М.Д.</i>	
Количественное определение каротиноидов в растительных маслах ..	63
<i>Дмитриева И.Б., Чухно А.С., Соловьева М.А., Сухоруков А.А.</i>	
Влияние препаратов инсулина на физико-химические свойства компонентов крови	71
<i>Колесник Д.А., Куваева Е.В., Яковлев И.П., Ксенофонтова Г.В., Шапранов Е.Г.</i>	
Синтез новых производных 6-гидроксипиримидин-4(3Н)-она и исследование их биологической активности «in silico»	77
<i>Крысько М.В., Стрелова О.Ю.</i>	
Проведение сегментационного анализа волос с применением ферментативного гидролиза папаином	83
<i>Кулешов Д.О., Кулешова Т.Э., Галль Л.Н.</i>	
Унитиоловый тест: инструмент изучения влияния слабых физических факторов на живые организмы	90
<i>Мартынова Ю.З., Хайруллина В.Р., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г.</i>	
Виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов дезоксисуридинтрифосфатазы	93
<i>Мартынова Ю.З., Хайруллина В.Р., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г.</i>	
Поиск соединений с противогерпетической активностью среди ингибиторов тимидинкиназы	98
<i>Петрачев А.С., Асташина Н.Б., Соснин Д.Ю.</i>	
Разработка нового метода обезболивания мелких лабораторных животных	103
<i>Попихина М.М., Пузык М.В.</i>	
Спектральные исследования водного экстракта <i>Hibiscus subdariffa</i>	106
<i>Попов А.С., Иванова И.С.</i>	
Характеристики эффективности флотационной очистки промышленных вод, содержащих масло-жировые и белковые загрязнения	113
<i>Рейпольская Т.Ю., Субботина Т.Ф.</i>	
Моделирование in silico взаимодействия митохондриальных хуманиноподобных пептидов с ионами двухвалентных металлов	119

<i>Решеткина Д.А., Соколова М.О., Полосков А.И.</i> Микронизация биологически активных комплексов как способ повышения биодоступности лекарственных препаратов для местного применения	125
<i>Сальникова О.П., Фатьянова А.В., Яровая О.И., Салахутдинов Н.Ф.</i> Активность трансфераз крови в условиях длительного введения разных дозировок нового противовирусного агента камфецина	131
<i>Сараева Т.А.</i> Соли хинолина в синтезе новых производных тетрагидропирроло[1,2-а]хинолинов.....	137
<i>Степашкин Н.А.</i> ζ-Потенциал пленок Ленгмюра–Блджетт стеариновой кислоты на поверхности раствора электролита	140
<i>Суходолов Н.Г.</i> Золь-гель синтез хромита лантана с помощью микроволнового излучения	145
<i>Таканаев А.А., Яровая М.А., Юшкова Е.И.</i> Синтез и фармакологические свойства йодметилат поли- (β-гексаметиленимин)-этилакрилата как практическое применение элективного курса «Композитные материалы в медицине»	150
<i>Фадеев Г.Н., Богатов Н.А., Болдырев В.С.</i> Биологически активная система в поле низкочастотных воздействий.....	155
<i>Шевченко О.В., Тананаев И.Г., Медков М.А., Апанасевич В.И., Плехова Н.Г., Юдаков А.А., Лукьянов П.А.</i> Разработка молекулярных комплексов хлорина Еб с европием, способных к генерации активных форм кислорода с перспективой применения в области радиофотодинамической терапии	161
<i>Шемарова И.В., Кузнецов В.А., Лавлинская М.С.</i> Определение цитотоксичности и биологической активности наночастиц сукцината хитозана на клетках миеломной линии RPMI8226 и фибробластах кожи человека	167

<i>Шлейкин А.Г., Чухно А.С., Шерстнев В.В., Романенко М.С.</i> Кинетика гелеобразования белков (на модельной системе – бычий сывороточный альбумин)	174
<i>Яговкин И.В., Лужанин В.Г.</i> Фитохимический анализ вторичных метаболитов трутовика обыкновенного (<i>Fomes Fomentarius L.</i>)	181
СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ	186
<i>Анненко И.Ю.</i> Динамика тестостерона в слюне у гандболистов высокой квалификации в ходе реализации различных программ предсоревновательной подготовки	186
<i>Анненко И.Ю.</i> Применение озонохемилюминесценции при оценке реакции гандболистов на физическую работу	191
<i>Анимова П.В., Болдина Н.В.</i> Клиническая диагностика болезни Крона	196
<i>Асатрян Т.Т., Жиленкова Ю.И., Зенина М.Н., Зимина В.А., Гайковская Л.Б.</i> Диагностика врожденных состояний патологии эритроидного роста	198
<i>Бакакина Ю.С., Бабарико Д.В., Шингель А.М., Сяхович В.Э., Николаевич Л.Н., Беляев С.А., Прадун С.А.</i> Исследование гликопротеомного профиля клеток гепатоцеллюлярного рака в условиях <i>in vitro</i> с использованием методов протеомики	205
<i>Бобровицкая А.И., Захарова Л.А., Карачаева Е.С.</i> Иммунологические нарушения показателей клеточного и гуморального звена иммунитета при хроническом вирусном гепатите В или С у детей	211
<i>Бяловский Ю.Ю., Ракитина И.С.</i> Показатели периферической крови при увеличенном сопротивлении дыханию	216

<i>Великанова Л.И., Шафигуллина З.Р., Ворохобина Н.В., Стрельникова Е.Г., Лисицын А.А.</i>	
Сравнительный селективный забор крови из надпочечниковых вен у больных с первичным гиперальдостеронизмом по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии	222
<i>Владимирова Ю.В.</i>	
Клинико-лабораторные параллели у пациентов с ПЭВР при различных видах катаракт	229
<i>Гайковская Л.Б., Шеламова Д.А., Ермаков А.И., Гулордава М.Д., Замятина К.Н.</i>	
Показатели нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у пациентов с псориазом на стандартной терапии.....	236
<i>Галькович К.Р., Соснин Д.Ю., Кривцов А.В.</i>	
Концентрация моноцитарного хемотаксического протеина и прокальцитонина в эякуляте у здоровых мужчин и у пациентов с нарушением сперматогенеза.....	243
<i>Гоманова Л.И., Сытая Ю.С., Канишина Н.Н.</i>	
Омиксные технологии как современный этап персонализированной лабораторной диагностики сепсиса	247
<i>Горбенко Д.А., Шкоденко Л.А., Мальцева Ю.И., Рубель М.С., Штро А.А., Зарубаев В.В., Слита А.В., Колпащиков Д.М.</i>	
Пероксидазоподобные дезоксирибозимы для детекции бактериальных и вирусных патогенов	253
<i>Завьялова О.А., Алмазова Е.В., Горелова А.Е., Абаленихина Ю.В., Оськина Л.Д.</i>	
Оценка степени окислительного стресса в сыворотке крови пациентов с гломерулярным повреждением почек.....	260
<i>Ибатов Ш.М., Мухамадиев Н.К.</i>	
Газохроматографическая оценка эффективности лечения рахита у детей	266
<i>Карпова Н.С., Дмитренко О.П.</i>	
Использование результатов ассоциативных исследований в качестве факторов риска развития заболеваний, ассоциированных с возрастом, на примере возрастной макулярной дегенерации.....	271

<i>Малахова М.Я., Стюф И.Ю., Большакова Г.Д., Балакова Н.И., Жиленкова Ю.И., Зимина В.А., Зенина М.А., Карпич С.А., Качанова Е.В., Сяпина Т.В.</i>	
Особенности результатов лабораторных анализов у пациентов с COVID-19 при разной тяжести заболевания	276
<i>Мироненко О.В., Суворова О.К.</i>	
Организация лабораторного производственного контроля технологий термического обезвреживания медицинских отходов классов «Б» и «В»	286
<i>Митюкова Т.А., Докукина Т.В., Полулях О.Е.</i>	
Нейротрофические и нейроиммунные показатели при оценке эффективности транскраниальной магнитной стимуляции у детей с аутизмом	292
<i>Налькин С.А., Соколова М.Г., Лобзин С.В., Кокоренко В.Л., Васильева Н.В., Фролова Е.В., Аак О.В.</i>	
Новые возможности применения диагностического критерия – концентрации антител к ацетилхолиновым рецепторам при миастении.....	297
<i>Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В.</i>	
Оккультная форма хронического вирусного гепатита В, способы выявления у доноров крови	301
<i>Плехова Н.Г., Невзорова В.А., Черненко И.Н., Присеко Л.Г., Степанюгина А.К.</i>	
Прогнозирование исходов и рисков сердечно-сосудистых заболеваний с применением машинного обучения	305
<i>Погорелова Е.И., Буданова М.В., Панина О.А.</i>	
Неоптерин как прогностический фактор течения острых респираторных инфекций.....	310
<i>Прохорова В.А., Хассан Х., Старкова П.С., Рубель М.С., Зайчикова М.В., Даниленко В.Н., Колпащиков Д.М.</i>	
Диагностика однонуклеотидных полиморфизмов штаммов.....	315
<i>Раббимова Г.Т., Мухамадиев Н.К., Дустов С.И.</i>	
Диагностическое значение параметров эндогенной интоксикации и содержания маркеров микроорганизмов при угрозе прерывания беременности.....	321

<i>Рисс М.Е., Науменко Е.С., Черенков В.Г.</i> Цифровые подходы в диагностике ранних признаков поверхностно распространяющихся меланом	327
<i>Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Денисова А.Р., Тотолян А.А.</i> Современные подходы к генодиагностике при орфанных иммунодефицитах.....	332
<i>Серикова Е.Н., Останкова Ю.В., Семенов А.В.</i> Анализ специфичности и чувствительности метода выявления вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке	335
<i>Соснин Д.Ю., Галькович К.Р., Кривцов А.В.</i> Особенности протеома семенной плазмы и сыворотки крови.....	339
<i>Сырвакова А.О.</i> Диагностические перспективы пониженной регуляции микроРНК при колоректальном раке	344
<i>Сырвакова А.О.</i> Комплексная диагностика злокачественных новообразований.....	351
<i>Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Семенов А.В.</i> Разработка метода выявления клинически значимых мутаций вируса иммунодефицита человека с использованием таргетного массированного параллельного секвенирования	355
<i>Эль-Диб Ахмед А., Заблоцкая С. С., Рубель М.С., Комиссаров А.Б., Колпацников Д.М.</i> ДНК-машина для определения nCOV-SARS-2019	358

Уважаемые коллеги!

Перед вами сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине», состоявшейся 03 декабря 2020 года в Санкт-Петербурге, организованной кафедрой биологической и общей химии им. В.В. Соколовского ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Особенностью кафедры является то, что она объединяет преподавателей и ученых различных специальностей – химиков, биохимиков, врачей и педагогов, и преподает фундаментальные дисциплины студентам младших курсов медицинского ВУЗа. При этом химико-биологические знания являются основой для клинических и гигиенических кафедр. Учитывая преемственность знаний от младших курсов к старшим, нам представляется своевременным и необходимым проведение конференции «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» с привлечением специалистов химико-биологического, медико-профилактического профиля и фундаментальной медицины, как создание платформы для широкой научной дискуссии, обмена опытом и представления научных результатов аспирантов и молодых ученых. Надеюсь, что конференция получит отклик у ученых, преподавателей и врачей различных специальностей, и традиция проводить подобную конференцию будет продолжаться.

К сожалению, в этом году эпидемиологическая обстановка не позволит нам провести конференцию очно, но в будущем обязательно встретимся. Дорогие друзья, до новых встреч!

С уважением,
д.м.н., заведующий кафедрой
биологической и общей химии им. В.В. Соколовского
Гайковая Л.Б.

Становление кафедры биологической и общей химии им. В.В. Соколовского

*д.м.н., проф., проректор по науке
и инновационной деятельности Силин А.В.,
д.м.н., заведующий кафедрой биологической и общей химии
им. В.В. Соколовского Гайковая Л.Б.
(ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова МЗ РФ)*

В декабре 2019 года кафедре биологической химии исполнилось 110 лет. Кафедра биологической химии возникла на основе кафедры физиологической химии Психоневрологического института в 1909 году. В 2011 году после объединения СПбГМА им. И.И. Мечникова и СПбМАПО кафедра биологической химии с курсом биоорганической химии была объединена с кафедрой неорганической химии. Объединенная кафедра получила название кафедра биологической и общей химии.

Первым заведующим кафедрой биологической химии, которая возникла на основе кафедры физиологической химии Психоневрологического института, был профессор **Словцов Борис Иванович** с 1909 по 1912 г. Впоследствии Психоневрологический институт переименован в Государственный институт медицинских знаний (ГИМЗ).

Ильин Михаил Дмитриевич возглавлял кафедру биохимии ГИМЗа с 1919 по 1931 год. Круг его научных интересов включал химию белка, лецитинов, эмбриохимию и практические вопросы биохимии питания.

С 1931 по 1936 г. кафедрой заведовал Харит Абрам Юделевич, выпускник ГИМЗ-а. В эти годы на кафедре занимались биохимией ферментов. Впервые со времени основания кафедры доцент В.С. Васюточкин (впоследствии профессором, начальником кафедры биохимии Военно-медицинской морской академии) проводил занятия по повышению квалификации врачей.



**Ильин Михаил Дмитриевич
(1866–1942)**

Шмидт Александр Александрович (1892–1978), академик АН Латвийской ССР (1945) – крупнейший витаминолог, руководил кафедрой с 1936 по 1946 г. В этот период кафедра сотрудничала с витаминным институтом пищевой про-

мышленности, созданным под руководством А.А. Шмидта на основе витаминной лаборатории больницы им. И.И. Мечникова. В 1941 году была опубликована его монография «Аскорбиновая кислота, ее природа и значение в живом организме». Заслугой Шмидта А.А. и К.З. Тульчинской была разработка метода получения витамина «С» из хвои необходимого для витаминизации армии и больных в госпиталях в период блокады Ленинграда.

Обязанности заведующего кафедрой с 1946 по 1948 г. выполняла доцент Екатерина Николаевна Морозова (1907-1989).

Недзвецкий Сергей Вуколович (1899-1968), кафедру возглавлял с 1948 по 1967 г., профессор, д.м.н. С.В. Недзвецкий объединил в один коллектив 3 кафедры: биохимии, органической химии, физической и коллоидной химии. С.В. Недзвецкий – специалист с мировым именем в области обмена холестерина.

Обязанности заведующего кафедрой с 1967 по 1969 г. выполнял доцент **Валерий Николаевич Колмаков** (1929-1989), выпускник ЛСГМИ, воспитанник кафедры. За эти годы были защищены 4 кандидатские диссертации, запланированные С. В. Недзвецким.

С 1969 по 1985 гг. кафедрой заведовал д.м.н., профессор **Соколовский Виктор Владимирович**. Основным научным интересом В.В. Соколовского было изучение биохимических механизмов действия факторов окружающей среды. Основная роль в его учении принадлежала тиолдисульфидной системе как ключевому звену антиоксидантной защиты в биохимическом механизме адаптации организма к экстремальным факторам окружающей среды и космофизическим факторам. Обнаруженная зависимость скорости реакции окисления унитиола от уровня солнечной активности



Недзвецкий Сергей Вуколович
(1899–1968)



Соколовский Виктор Владимирович
(1925–2018)

легла с основу новых представлений о космической регуляции жизни на Земле – регуляции окислительно-восстановительного состояния среды, в том числе организма человека и животных. В 2004 г. Российской академией наук было зарегистрировано научное открытие «Явление внешне обусловленных регулярных флуктуаций скорости окислительно-восстановительных реакций». В. В. Соколовским опубликовано более 110 научных работ, 3 монографии, 3 сборника научных работ, 3 учебно-методических пособия; под его руководством выполнены 16 кандидатских и 1 докторская диссертация. В декабре 2019 года решением Ученого совета ФГБОУ ВО Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова МЗ РФ кафедре биологической и общей химии было присвоено имя В.В.Соколовского (приказ №2406-0 от 31 декабря 2019 года).

С 1985 по 1987 г. обязанности заведующего кафедрой выполнял доцент В.Н. Колмаков.

Дадали Владимир Абдулович (1937 г.р.) – д.х.н., профессор возглавлял кафедру с 1987 по 2012 г. Основным научным направлением кафедры было изучение детоксицирующего и модифицирующего активность глутатион-зависимых ферментов действия синтетических веществ, а также индукторов митохондриогенеза и трансфер-фактора. В этот период на кафедре проводилась подготовка специалистов по специальности «лабораторное дело», а также преподавание на английском языке студентам факультета иностранных учащихся. Под руководством Дадали В.А. были защищены 2 докторские, 6 кандидатских диссертаций, опубликовано 8 монографий, более 185 статей в журналах и в сборниках. В период заведования кафедрой профессора Дадали В.А. произошло объединение двух кафедр биологической химии с курсом биоорганической химии и неорганической химии. Кафедра химии имеет свою историю.

Основателем кафедры физической химии в 1911 году в Психоневрологическом институте считается **Писаржевский Лев Владимирович** (1874-1938) – химик, профессор (1904), действительный член АН СССР (1930).

С 1913 по 1930 г. кафедрой неорганической, аналитической и физической химии ГИМЗа заведовал член-корреспондент АН СССР (1946), з.д.н. РСФСР (1943), профессор **Жуков Иван Иванович** (1880-1949) – основатель отечественной школы коллоидной химии.

Лебединский Вячеслав Васильевич (1888-1956) возглавил кафедру неорганической, аналитической и физической химии 2-го ЛМИ



**Писаржевский
Лев Владимирович
(1874–1938)**



**Жуков
Иван Иванович
(1880–1949)**



**Лебединский
Вячеслав Васильевич
(1888–1956)**

в 1930 году. В.В. Лебединский – химик, профессор (1931), член-корреспондент АН СССР (1946), лауреат Сталинской премии (1946), з.д.н. РСФСР (1947). Большая часть его работ носила секретный ха-

рактик (изучал химию комплексных соединений платины, родия, иридия и других металлов).

С 1936 по 1941 г. заведовал кафедрой **Ашмарин Петр Александрович** (1888-1941), д.б.н., профессор (1935). Автор 32 научных работ, среди которых «Кислотно-щелочные отношения в организме и деятельность желудочно-кишечного тракта» (1928), «О щелочном катализе превращений моносахаридов» (1935).

С 1944 по 1949 г. кафедрой руководил з.д.н. (1944) академик **Курбатов Владимир Яковлевич** (1878-1957). В.Я. Курбатов автор более 400 печатных трудов по физической и коллоидной химии, в частности «Введение к изучению и практическим занятиям по физической химии» (1926).

Бресткин Александр Павлович (1912-1993) – химик, биолог, д.б.н. (1953), профессор (1954), лауреат Государственной премии (1979) возглавлял кафедру неорганической химии ЛСГМИ с 1952 по 1963 г. А.П. Бресткин в 1953 году защитил докторскую диссертацию по кесонной болезни.

С 1949 по 1953 г. и с 1963 по 1967 г. кафедрой заведовала доцент Е.Г. Прокофьева, а с 1968 по 1979 г. – к.х.н. Р.Т. Каньковский.

В 1979 году кафедру химии возглавил **Слесарев Валерий Иванович** (г.р. 1940), д.х.н. (1992), профессор (1993), действительный член РАЕН (2005). Научные работы посвящены алкилированию и прототропии полифункциональных гидроксипиримидинов (автор более 170 работ), а с 1994 года на кафедре химии развивалось новое направление квантово-химических расчетов биологически активных соединений. В.И. Слесарев подготовил учебник для студентов медицинских вузов «Химия. Основы химии живого», который стал победителем Всероссийского конкурса учебников (1996). Совместно с академиком РАМН А.В. Шабровым было получено свидетельство о научном открытии в области химии водных систем.

Макаров Валерий Геннадиевич, профессор, д.м.н., руководил объединенной кафедрой с 2012 по 2013 г. Еще в 1989 г. на кафедре был образован Межрегиональный центр «Адаптоген», который возглавлял доцент кафедры В.Г. Макаров. В центре проводились доклинические исследования растительных препаратов адаптогенного действия. В дальнейшем центр был преобразован в Институт фармации, который в настоящее время возглавляет профессор Макаров В.Г.

С 2014 года заведует кафедрой **Гайковая Лариса Борисовна**, д.м.н., выпускница ЛСГМИ (1985). Научным направлением кафедры является изучение изменений метаболизма клеток (жизнеспособности, окислительного стресса, митохондриального мембранного потенци-

ала) современными лабораторными методами при воздействии различных биологически активных веществ. За 5 лет на кафедре опубликовано 157 научных трудов, из них 1 монография, 64 статьи в журналах (ВАК, Web of Science, Scopus), 89 тезисов и статей в сборниках, а также 8 учебно-методических пособий для студентов и 2 учебных пособия для аспирантов. Сотрудники кафедры выступали с докладами на 94 конференциях. В настоящее время на кафедре проходят обучение 5 заочных аспирантов по различным направлениям клинической и фундаментальной биохимии.

В настоящее время кафедра биологической и общей химии им. В.В. Соколовского – это коллектив единомышленников, который основывает свою работу на сочетании опыта и знаний старшего поколения преподавателей и энтузиазма молодых сотрудников. Кафедра создает свои новые традиции, позволяющие ей развиваться и решать сложные проблемы по преподаванию химии и биохимии студентам младших курсов. Коллектив кафедры с оптимизмом смотрит в будущее, так как уверенно стоит на позициях профессионализма и инновационных технологий.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ХИМИИ ПРИРОДНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, А ТАКЖЕ ПРИМЕНЕНИЕ ХИМИИ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

УДК 616-053.4

Абдужаппарова Н.Э.

*Ферганский филиал Ташкентской медицинской академии
Республика Узбекистан, Фергана
naziraxoneriklievna@gmail.com*

Ядовитые химикаты, снижающие IQ у детей

Учеными выявлены химические вещества, действующие на полноценное развитие ребенка, в частности, снижающие IQ на раннем возрасте. Эти химические соединения входят в состав пластиковых посуд, чистящих средств, косметик и других веществ. Во избежание этого явления рекомендуется минимизировать вредных химикатов и воспользоваться их аналогами из натуральных продуктов.

Ключевые слова: *снижение IQ, ксенобиотик, бисфенолы, фталаты, хлорпирифос, триклозан, полифторалкильные вещества, органический аналог.*

Abdujapparova Nazirakhon Erikli qizi

*The Fergana branch of the Tashkent medical academy
The Republic of Uzbekistan, Fergana*

Harmful chemicals that lower IQ in children

Scientists have identified chemicals that affect the full development of a child, in particular, lowering IQ at an early age. These chemical compounds are found in plastic dishes, cleaning products, cosmetics and other substances. To avoid this phenomenon, it is recommended to minimize harmful chemicals and use their counterparts from natural products.

Key words: *IQ reduction, xenobiotic, bisphenols, phthalates, chlorpyrifos, triclosan, polyfluoroalkyl substances, organic analog.*

Ученые обнаружили, что дети, в организме матерей которых во время беременности были повышены содержания ряда химических веществ, нарушающих работу эндокринной системы, в первую очередь бисфенола, к семи годам заметно отстают по уровню IQ от своих сверстников. Результаты исследования опубликованы в журнале Environment International.

Некоторые химические соединения, входящие в состав бытовой химии, пластиковых контейнеров для пищевых продуктов и напитков, других потребительских товаров, относятся к ксенобиотикам, — веществам, нарушающим эндокринную, то есть гормональную активность у людей. Существует много исследований, показывающих, что повышенные содержания в организме беременных женщин таких веществ, как бисфенолы, фталаты или пестициды приводят к нарушениям развития нервной системы у новорожденных детей. Однако ранее не проводилось изучение комплексного действия всей группы ксенобиотиков на последующее развитие детей, вплоть до достижения ими школьного возраста.

Ученые из Карлстадского университета в Швеции совместно с их американскими коллегами из Медицинской школы Маунт Синай в Нью-Йорке изучили анализы крови и мочи 718 женщин, находящихся на первых трех месяцах беременности, на предмет содержания химических веществ, предположительно влияющих на эндокринную систему количеством 26 веществ. Анализы были получены в 2007-2010 годах в родильных клиниках города Вермланд в Швеции в рамках программы SELMA (Swedish Environmental Longitudinal Mother and Child, Asthma and Allergy).

По мере того, как рожденные этими женщинами дети достигали семилетнего возраста, исследователи оценивали их показатель IQ. Обнаружилось, что у тех детей, особенно у мальчиков, чьи матери имели более высокий уровень ксенобиотиков в организме во время беременности, коэффициент интеллекта был ниже.

Самое сильное влияние на снижение IQ у детей оказывает бисфенол F — один из компонентов бытового пластика. Примечательно, что это соединение было создано учеными как безопасная замена своему опасному предшественнику бисфенолу А.

На здоровье плода на ранних стадиях беременности, что впоследствии выражается в низком уровне IQ ребенка, по мнению авторов работы, влияют также инсектицид — хлорпирифос; полифторалкильные вещества, которые содержатся в чистящих средствах; триклозан, добавляемый в антибактериальное мыло; и фталаты, которые содержатся в мягких поливинилхлоридных пластике и косметике.

«Большинство исследований оценивают одно химическое вещество, однако люди подвергаются воздействию многих химических веществ одновременно, и это воздействие может быть вредным, даже если влияние каждого отдельного продукта находится на низком уровне», — дополняет автора исследования Эва Таннер из Медицинской школы Маунт Синай.

Несмотря на то, что перечисленные выше химические вещества, поступая в организм взрослого человека способны выделяться быстро, даже их малое количество, проникая в организм беременной женщины, могут оказать неблагоприятное воздействие на развитие плода. Поэтому беременным женщинам, особенно на раннем сроке, ученые рекомендуют избегать химически агрессивной продукции, заменяя ее органическими аналогами.

Список литературы

1. Е.М.Таннер, М.У. Халлерберг, С.Викстром, К.Линд «Раннее пренатальное воздействие смеси с подозреваемыми эндокринными разрушителями связано с более низким IQ в возрасте семи лет». Environment International 105185, 2019. С 2855.
2. Дж. Аннамалай, В. Намасиваям «Химические вещества, разрушающие эндокринную систему в атмосфере: их влияние на людей и дикую природу». Environment International 76, 2015. С 78.
3. Р. Баруки, П.Д. Глюкман, П. Гранджин, М. Хэнсон, Дж. Дж. Heindel «Истоки развития неинфекционных заболеваний: значение для исследований и общественного здравоохранения». Environment Healthy 11, 2012. С 42.

УДК 577.29

Акуневич А. А.

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»
Республика Беларусь, Минск
akunevichna@bsmu.by*

Оценка межмолекулярных взаимодействий между факторами роста эмбриональной бычьей сыворотки и рецептором эпидермального фактора роста культуры клеток HeLa

Описаны виды межмолекулярных взаимодействий, возникающих в комплексах факторов роста, содержащихся в эмбриональной бычьей сыворотке, с рецептором эпидермального фактора роста культуры клеток HeLa. Показано, что бетацеллюлин бычьей сыворотки обладает наибольшей аффинностью к данному рецептору, что может влиять на оценку антагонистической активности разрабатываемых пептидов in vitro.

Ключевые слова: фактор роста, эмбриональная бычья сыворотка, рецептор эпидермального фактора роста, моделирование, макромолекулярный докинг.

**Evaluation of intermolecular interactions between growth factors
of fetal bovine serum and epidermal growth factor receptor
of HeLa cell culture**

The types of intermolecular interactions arising in the complexes of growth factors from fetal bovine serum with the epidermal growth factor receptor of HeLa cell culture are described. It has been shown that bovine serum betacellulin has the highest affinity to this receptor. This observation could affect the activity assessment in vitro of newly developed antagonists.

Key words: *growth factor, fetal bovine serum, epidermal growth factor receptor, modeling, macromolecular docking.*

Введение. Культура клеток HeLa является одной из наиболее популярных моделей *in vitro* для исследований в области клеточной биологии и канцерогенеза. Эта культура представляет собой клетки эпителиоидной карциномы шейки матки человека и, как правило, выпускается в виде взвеси клеток в ростовой среде, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS от англ. «fetal bovine serum»). Клетки HeLa имеют эпителиоподобную морфологию и экспрессируют рецептор эпидермального фактора роста (EGFR от англ. «epidermal growth factor receptor»), что позволяет их использовать в исследовании активности молекул *in vitro* в отношении опухолей эпителиального генеза [1]. EGFR активируется семью факторами роста, которые делятся на две группы в зависимости от своей аффинности. Лигандами с высоким сродством являются эпидермальный фактор роста (EGF от англ. «epidermal growth factor»), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α от англ. «transforming growth factor alpha»), бетацеллюлин (BTC от англ. «betacellulin») и гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF от англ. «heparin-binding epidermal growth factor») [2]. Данные факторы роста имеют в своей структуре консенсусную последовательность — EGF-подобный домен, существенно важный для биологической активности лиганда: за счет него происходит связывание лиганда с внеклеточными доменами EGFR [2,3]. EGF-подобный домен содержит шесть остатков цистеина, формирующих три внутримолекулярные дисульфидные связи (C₁-C₃, C₂-C₄, C₅-C₆), и в общем виде имеет последовательность CX₇CX₄₋₅CX₁₀₋₁₃CXCX₈C, где С — аминокислотные остатки цистеина, X — другие аминокислотные остатки [3]. Состав и содержание

факторов роста в FBS различается в силу естественного происхождения данной среды. Тем не менее содержание BTC в FBS является наиболее высоким относительно других факторов роста: его концентрация может достигать 4,0 нг/мл, тогда как концентрация EGF и TGF- α — 1,0 нг/мл [4,5]. По этой причине в ходе дизайна исследования активности антагониста *in vitro* и оценке его вероятной ингибирующей концентрации, необходимо определить характер и прояснить молекулярные механизмы взаимодействия факторов роста FBS, способных выступать в качестве агонистов, с рецептором EGFR культуры клеток HeLa.

Материалы и методы. Трёхмерные структуры пептидов бычьего EGF (bEGF), бычьего TGF- α (bTGF- α) и бычьего BTC (bBTC) были смоделированы на сервере Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) [6]. На основании того, что все исследуемые факторы роста имеют консервативный EGF-подобный домен, при их моделировании в качестве шаблона использовалась структура человеческого EGF (hEGF) из комплекса с его рецептором (PDB ID 1IVO). Белок-белковый докинг лигандов bEGF, bTGF- α , bBTC с рецептором человеческого EGFR (hEGFR) (PDB ID 1IVO) осуществлялся на сервере ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/>) [7]. Для тестирования данного алгоритма предварительно был проведён докинг hEGF и hEGFR (PDB ID 1IVO). Конформационная структура предсказанного комплекса hEGF-hEGFR соответствовала строению экспериментально полученных комплексов, размещённых в PDB (ID 1IVO, 1NQL, 3NJP). Для каждого из комплексов исследуемых факторов роста с hEGFR в ходе докинга было построено от 19 до 24 моделей. Для анализа были отобраны первые модели из каждой группы результатов докинга, что соответствовали известной структуре hEGF-hEGFR, полученной методом рентгеноструктурного анализа. Эти модели имели наибольший размер кластера, формируемого алгоритмом ClusPro 2.0 в результате объединения тысячи структур с наименьшей энергией связывания. Иными словами, отобранные для анализа модели являлись наиболее геометрически выгодными. Определение характера межмолекулярных взаимодействий между лигандом и рецептором в пределах 7 Å и подсчет их количества в полученных моделях комплексов осуществлялся на сервере PIC (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>), расчет свободной энергии Гиббса (ΔG) как интегрального показателя, характеризующего силу и характер межмолекулярных взаимодействий между лигандом и рецептором, и константы диссоциации комплекса (Kd) при 37 °C — на сервере Prodigy (<https://bianca.science.uu.nl/prodigy/>) [8,9]. Выравнивание аминокислотных последовательностей bEGF, bTGF- α , bBTC и hEGF осуществлялось в программе MEGA 10.

Результаты и обсуждение. Типы и количество межмолекулярных взаимодействий между лигандом и рецептором смоделированных комплексов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Межмолекулярные взаимодействия между лигандом и рецептором комплексов hEGF-hEGFR, bEGF-hEGFR, bTGF- α -hEGFR и bBTC-hEGFR

Показатель		hEGF-hEGFR	bEGF-hEGFR	bTGF- α -hEGFR	bBTC-hEGFR
Расчетная ΔG , ккал/моль		-16,0	-15,2	-15,1	-16,7
Расчетная Kd при 37°		5,0-10-12	2,0-10-11	2,4-10-11	1,5-10-12
Межмолекулярные взаимодействия	Гидрофобные	17	10	13	13
	Водородные связи между главными цепями аминокислотных остатков	5	3	0	3
	Водородные связи между главными и боковыми цепями аминокислотных остатков	21	20	20	17
	Водородные связи между боковыми цепями аминокислотных остатков	16	29	27	27
	Ионные	4	4	4	5
	Ароматические	1	2	1	1
	Катион-пи	3	3	2	1
	Всего,	67	71	67	67
	среди них:				
	с первым доменом рецептора	26	18	24	21
с третьим доменом рецептора	41	53	43	46	

Наибольшее количество межмолекулярных взаимодействий характерно для комплекса bEGF-hEGFR. При этом связывание лиганда bEGF с третьим доменом hEGFR более выражено относительно других исследуемых пептидов: bEGF образует с третьим доменом рецептора на 7–12 связей больше.

В ряду комплексов bTGF- α -hEGFR, bEGF-hEGFR, hEGF-hEGFR, bBTC-hEGFR расчетная энергия связи между лигандом и рецептором растёт по модулю, тогда как расчетная константа диссоциации уменьшается. Это может быть свидетельством того, что bBTC способен образовывать более прочные и устойчивые комплексы (обладать более высокой аффинностью) в сравнение с другими исследуемыми лигандами.

Исследуемые факторы роста, содержащиеся в FBS, образуют большее количество водородных связей между боковыми цепями аминокислотных остатков (от 27 до 29 связей) в сравнение с комплексом hEGF-hEGFR (16 связей). Напротив, число гидрофобных взаимодействий и водородных связей между главными цепями аминокислотных остатков в данных комплексах меньше.

Снижение количества гидрофобных взаимодействий, вероятно, объясняется тем, что число гидрофобных остатков аминокислот (ароматических и алифатических неполярных) во всех факторах роста, содержащихся в бычьей сыворотке, меньше, чем в hEGF. Основными аминокислотными остатками, вступающими в данный тип взаимодействий в комплексе hEGF-hEGFR, являются Leu15, Tyr44, Leu47, образующие от 3 до 5 связей. Напротив, в факторах роста, содержащихся в FBS, в данных положениях находятся аминокислотные остатки глутаминовой (44 положение bTGF- α и bBTC) и аспарагиновой (47 положение bTGF- α и bBTC) кислот, для которых формирование гидрофобных взаимодействий не характерно. Основными аминокислотными остатками, вступающими в данный тип взаимодействий в комплексах bTGF- α -hEGFR и bBTC-hEGFR, являются Leu48, Phe17 (bTGF- α) и Ile17 (bBTC), образующие от 3 до 5 связей. В комплексе bEGF-hEGFR таким остатком является Leu15, образующий 4 связи. Во всех исследуемых комплексах наибольшее количество гидрофобных взаимодействий формируется между лигандом и третьим доменом рецептора.

Число водородных связей между главными и боковыми цепями аминокислотных остатков в исследуемых комплексах является схожим. В hEGF основными аминокислотными остатками, вступающими в данный тип взаимодействий, являются Asp11, Gly12 и Gln43, образующие по 2 связи, а также Asn32, образующий 6 водородных связей. В bEGF отсутствует Asn32, однако есть остатки Gly39 и Asp48, которые образуют по 2 и 3 связи соответственно. Основными аминокислотными остатками, вступающими в данный тип взаимодействий в комплексе bTGF- α -hEGFR, является Arg22 и Glu44, которые образуют 6 и 4 водородные связи соответственно. В bBTC такими остатками, являются Lys13, Arg22, His14, образующие от 3 до 4 связей.

Водородные связи между боковыми цепями аминокислотных остатков вносят наибольший вклад в сродство bEGF с третьим доменом hEGFR. Каждый из аминокислотных остатков bEGF Tyr37, Tyr48, Asn16 и Asp48 образует от 2 до 4 дополнительных связей. Наибольшее количество новых водородных связей образуется между боковыми цепями в комплексах факторов роста, содержащихся в бычьей сыворотке, с рецептором. В bEGF образуется заметно большее количество водородных связей между боковыми цепями за счет остатков Asp48 и Asn16, формирующих от 2 до 4 связей. Дополнительно остатки Tyr37, Asp51 и Asp48 образуют по две связи. От 4 до 6 связей в комплексе bTGA- α -hEGFR образуют остатки Asp47, His45, Arg42. В комплексе bBTC-hEGFR аминокислотные остатки Glu36, Arg42, Gln16, Arg45, Arg42 также образуют от 4 до 6 связей.

Число ионных взаимодействий также остаётся одинаковым во всех исследуемых комплексах за исключением bBTC-hEGFR. В данном комплексе аминокислотный остаток Lys13 образует дополнительную связь с третьим доменом рецептора. В комплексах hEGF-hEGFR, bEGF-hEGFR и bTGF- α -hEGFR основными аминокислотными остатками, вступающими в ионные взаимодействия, являются Asp46 (hEGF, bEGF), Asp47 (bTGF- α) и Arg41 (hEGF, bEGF).

В ароматические взаимодействия с третьим доменом рецептора вступают остатки Tyr13 (hEGF), Phe10 и Phe47 (bEGF), Phe15 (bTGF- α) и Tyr15 (bBTC). В катион-пи взаимодействия — Trp49, Trp50 и Arg41 (hEGF, bEGF), Lys29 (bTGF- α), Arg42 (bTGF- α , bBTC).

Закключение. Культивирование клеток HeLa с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки повлияет на результаты исследования активности разрабатываемого антагониста hEGFR *in vitro*. Бетацеллюлин, обладая повышенной аффинностью и находясь в высокой концентрации, вероятно, будет занимать большое количество свободных лиганд-связывающих центров hEGFR. По этой причине для проявления и корректного изучения антагонистической активности разрабатываемого пептида в дизайне эксперимента необходимо предусмотреть стадию «сывороточного голодания» клеток либо использовать синтетическую смесь факторов роста с их заданной концентрацией.

Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ Б20М-025 от 04.05.2020.

Список литературы

1. Zhang F., Wang S., Yin L., Yang Y., Guan Y., Wang W., Xu H., Tao N. Quantification of epidermal growth factor receptor expression level and binding kinetics on cell surfaces by surface plasmon resonance imaging // *Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 87(19). P. 9960–9965.

2. Harris R.C., Chung E., Coffey R.J. EGF receptor ligands // *Experimental Cell Research*. 2003. Vol. 284(1). P. 2–13.
3. Roskoski R.Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer // *Pharmacological Research*. 2014. Vol. 78. P. 34–74.
4. Bastian S.E., Dunbar A.J., Priebe I.K., Owens P.C., Goddard C. Measurement of betacellulin levels in bovine serum, colostrum and milk // *Journal of Endocrinology*. 2001. Vol. 168(1). P. 203–212.
5. Zheng X., Baker H., Hancock W.S., Fawaz F., McCaman M., Pungor E. Proteomic Analysis for the Assessment of Different Lots of Fetal Bovine Serum as a Raw Material for Cell Culture. Part IV. Application of Proteomics to the Manufacture of Biological Drugs // *Biotechnology Progress*. 2008. Vol. 22(5). P. 1294–1300.
6. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., Beer T.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Research*. 2018. Vol. 46(1). P. 296–303.
7. Kozakov D., Hall D.R., Xia B., Porter K.A., Padhorny D., Yueh C., Beglov D., Vajda S. The ClusPro web server for protein-protein docking // *Nature Protocols*. 2017. Vol. 12(2). P. 255–278.
8. Tina K.G., Bhadra R., Srinivasan N. PIC: Protein Interactions Calculator // *Nucleic Acids Research*. 2007. Vol. 35(2). P. 473–476.
9. Xue L.C., Rodrigues J.P., Kastrius P.L., Bonvin A.M., Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes // *Bioinformatics*. 2016. Vol. 32(23). P. 3676–3678.

УДК 615.322, 54.384.2

*Астафьева О.В.¹, Генатуллина Г.Н.²,
Жаркова З.В.³, Ясенявская А.Л.⁴,
Арнаудова К.Ш.⁵, Якимец М.В.⁶, Самогруева М.А.⁷*
ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский
университет» Минздрава России
Россия, Астрахань
*astra39@list.ru¹, genatullina@mail.ru², morikova21@mail.ru³,
yasen_9@mail.ru⁴, arnaudova@mail.ru⁵, krivicheva@mail.ru⁶,
ms1506@mail.ru⁷*

Тысячелистник мелкоцветковый как источник биологически активных веществ с противомикробной активностью

Методом газовой хроматографии масс-спектрометрии идентифицировано 48 соединений, входящих в состав экстрактов растения

Achillea micrantha. Установлено, что экстракты растений данного рода проявляют антимикробную активность по отношению к *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Ключевые слова: тысячелистник мелкоцветковый, *Achillea micrantha*, биологически активные вещества, терпеноиды, антимикробная активность, экстрагирование.

*Astafyeva O.V.*¹, *Genatullina G.N.*², *Zharkova Z.V.*³,
*Yasenyavskaya A.L.*⁴, *Arnaudova K.Sh.*⁵,
*Yakimets M.V.*⁶, *Samotrueva M.A.*⁷
Astrakhan State Medical University
Russia, Astrakhan

***Achillea micrantha* as a source of biologically active substances with antimicrobial activity**

48 compounds identified in the extracts of the plant *Achillea micrantha* by the method of gas chromatography mass spectrometry. The extracts of plants of this genus exhibit antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: yarrow, *Achillea micrantha*, biologically active substances, terpenoids, antimicrobial activity, extraction.

Введение. Проблема развития лекарственной устойчивости представляет серьезную опасность для здоровья человека и снижает эффективность антибактериальной терапии и профилактики распространения инфекций. Несмотря на активную деятельность по контролю за антибиотикорезистентностью, устойчивость микроорганизмов к антимикробным лекарственным препаратам остается актуальным и значимым вопросом практического здравоохранения. Наряду с этим, одной из важнейших задач современной фармакологии остается выявление новых эффективных соединений с биологической активностью на основе растительного сырья, обладающих антимикробными свойствами и низким уровнем токсичности. Потенциальным источником новых лечебно-профилактических препаратов могут стать растения рода *Achillea*. Род *Achillea* семейства *Compositae* (*Asteraceae*) насчитывает около 150 видов. Произрастает в основном на территории Европы и Западной Азии, а также в Австралии, Новой Зеландии и Северной Америке [1]. Многими исследователями показано, что растения рода *Achillea*, обладают противовоспалительным [2,3], антиоксидантным [4], эстрогенным [5], противоязвенным [6], противоопухолевым [7], антисекреторным [8], иммуномодулирующим [9], противомикробным [10,11], фунгицидным [12] действием.

В ходе многочисленных экспериментов были выделены некоторые химические вещества из соцветий и травы тысячелистника *Achillea millefolium*: лактоны – ахилин, артилезин, гроссмизин, микрантин, кемпферол 3-рамнозид, кампестерин [13]; сесквитерпеновые лактоны – синтенин и микрантин [14]; эфирные масла [15]; флавоноиды [16]. По результатам ряда исследований сумма флавоноидов, содержащихся в тысячелистнике, была предложена в качестве компонентов противовоспалительных и гемостатических препаратов [17].

В медицине в основном используется *A. millefolium*, химический состав и свойства которого хорошо изучены, в отличие от *A. micrantha*. Хотя экспериментально установлено, что противомикробное действие экстрактов *A. micrantha* намного превосходит действие экстрактов *A. millefolium* [18].

Представленные литературные данные доказывают целесообразность экспериментального исследования химического состава экстрактов соцветий *A. micrantha* и испытания их в качестве антибактериальных средств.

Материалы и методы. Объектом исследования является тысячелистник мелкоцветковый *A. micrantha*. Для сравнения степени противомикробной активности были взяты экстракты тысячелистника обыкновенного *A. millefolium*, известного лекарственного растения.

Соцветия, листья и стебли *A. micrantha* были собраны в весенне-летний период (май-июнь) во время цветения на территории Приволжского района Астраханского региона.

Биологически активные вещества экстрагировали 40% водным раствором этанола при комнатной температуре в течение 7 дней при постоянном перемешивании.

Химический состав компонентов экстрактов определяли методом газовой хроматографии-масс-спектрофотометрии на хроматографе-масс-спектрометре Shimadzu GC/MS (QP-5050A, Shimadzu, Япония).

Антибактериальную активность экстрактов определяли в отношении тест-штаммов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* методом прямой диффузии в агар. Определяли минимальную бактерицидную концентрацию соединений (МБК), т.е. то его количество, после инкубации с которым роста колоний не обнаруживалось и минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), при которой отмечалась задержка роста микробактерий по сравнению с контролем на 50%. В качестве контроля использовали стандартный антибиотик гентамицин.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета «Анализ данных» в рамках программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Методом газовой хроматографии-масс-спектрофотометрии (ГС/МС) в этанольном экстракте соцветий *A. micrantha* было идентифицировано 19 соединений, из которых 17 соединений относятся к терпенам и их производным.

Среди 19 соединений наибольшее процентное содержание в экстракте приходится на пиперитон (34,15%), карвон (24,93%) и камфору (10,62), которые составляют 69,7% от общего объема экстракта.

Данные химические соединения, большая часть которых относится к группе биологически активных веществ – терпенов и их производных и выделенные экстракцией 40% этанольным раствором из соцветий *A. micrantha*, чаще всего обнаруживают в эфирных маслах. Предложенный способ получения этих веществ экстракцией этанольным экстрагентом позволяет получать комплекс органических веществ, которые входят в состав эфирных масел некоторых растений с противомикробными свойствами.

Комплекс обнаруженных соединений в экстрактах *A. micrantha* обладал выраженным ингибирующим действием в отношении ко всем исследуемым тест-штаммам. Как видно из табл. 1 наиболее сильное подавляющее действие проявлял экстракт соцветий *A. micrantha* в отношении *S. aureus*, схожее с действием гентамицина. Экстракты всех частей *A. micrantha* обладали более сильным антибактериальным действием, чем экстракты *A. millefolium*. Более выраженное антибактериальное действие экстракты *A. micrantha* показали к штамму *S. aureus*.

Таблица 1. Сравнительная антимикробная активность исследованных экстрактов растений (метод прямой диффузии в агар)

Образцы	Части растений	Диаметр зоны задержки роста $M \pm m$, мм			
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>
Гентамицин		42,0±1,4	26,0±0,8	16,0±0,5	33,2±0,3
<i>A. millefolium</i>	соцветия	15,2±1,8	12,4±1,2	10,0±0,4	22,8±0,8
	листья	14,1±1,5	11,8±0,9	7,0±1,7	н/и
	стебли	13,4±2,3	13,0±1,3	н/и	н/и
<i>A. micrantha</i>	соцветия	39,0±0,4	21,0±0,8	14,0±1,5	25,2±1,5
	листья	17,3±1,2	16,6±1,4	10,0±2,4	н/и
	стебли	20,5±1,2	19,5±1,0	9,7±1,3	н/и

Обнаруженное выраженное, сравнимое по активности с химическим специфическим антибиотиком, противомикробное действие экстракта *A. micrantha* обусловлено содержанием в нем в качестве основных компонентов терпеновых и фенольных соединений.

В последующих экспериментах определили МИК и МБК экстрактов *A. millefolium* и *A. micrantha* при воздействии на рост и развитие штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* (табл. 2).

Таблица 2. Противомикробная активность в отношении штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*

Образцы	Части растений	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
		МИК мкг/мл	МБК, мкг/мл	МИК мкг/мл	МБК, мкг/мл
Гентамицин		5,7±0,04	80,8±1,4	8,2±1,3	89,3±2,1
<i>A. millefolium</i>	Соцветия	6,4±1,2	89,3±14,1	0,49±0,01	78,3±1,8
<i>A. millefolium</i>	Листья	523,6±4,1	200,8±8,1	0,15±0,02	823,4±11,6
<i>A. millefolium</i>	Стебли	45,3±3,8	998,5±2,6	0,27±0,03	986,7±10,1
<i>A. micrantha</i>	Соцветия	6,2±1,9	85,1±14,1	0,54±0,01	78,7±1,3
<i>A. micrantha</i>	Листья	251,2±2,2	508,7±3,1	548,6±3,6	104,3±8,4
<i>A. micrantha</i>	Стебли	51,2±1,1	501,6±2,4	28,6±1,4	80,2±1,8

Анализ полученных результатов показал, что действие экстрагируемых соединений на рост и развитие *S. aureus* различно. Наибольшей противомикробной активностью обладают соцветия *A. micrantha* и *A. millefolium*. Показатели МИК этих экстрактов незначительно выше МИК гентамицина и несмотря на то, что превышают показатели антибиотиков, остаются стабильно низкими. МБК соцветия *A. millefolium* статистически достоверно не отличается от МБК антибиотиков сравнения. Экстракты стебля *A. millefolium* и *A. micrantha* в концентрациях, не превышающих 45-52 мкг/мл, оказывают стабильное бактериостатическое действие. В то же время, к экстракту листьев *A. millefolium* и *A. micrantha* бактерии рода *Staphylococcus* менее чувствительны.

В отношении бактерий рода *Streptococcus* активность выделенных соединений была также разнообразна. Экстракты соцветий *A. micrantha* и *A. millefolium* оказывают выраженное бактериостатическое действие, статистически идентичное действию антибиотика сравнения. Менее активными экстрактами, в отношении *Streptococcus*, оказались экстракты стеблей и листьев *A. millefolium* и *A. micrantha*, МИК которых была значительно выше таковой как антибиотиков, так и других изучаемых экстрактов.

Результаты проведённого исследования показали, что экстракты соцветий *A. millefolium* и *A. micranta* в отношении штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis* способны оказывать бактериостатическое и бактерицидное действие разной степени выраженности, что делает актуальным дальнейшее изучение их биологической активности.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших экспериментальных исследований экстрактов *A. micranta*. Остается актуальным изучение химического состава и свойств выделенных очищенных комплексов действующих веществ с антибактериальной активностью с целью создания препаратов, которые после соответствующих испытаний могут быть рекомендованы для применения в медицине.

Список литературы

1. Khani A., Asghari J. Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum* and the weevil, *Callosobruchus maculatus* // J. Ins. Sci. 2012. 12 (73). P. 1–10.
2. Saeidina S., Gohari A.R., Mokhber-Derfuli N. et al., A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea* // DARU. 2011. 19(3). P. 173–186.
3. Karaalp C., Yurtman A.N., Yavasoglu N.U.K. Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea* L. flower head extracts // Pharm. Biol. 2009. 47 (1). P. 86–91.
4. Vitalini S., Beretta G., Iriti M. et al. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity // Acta Biochimica Polonica. 2011. 58(2). P. 203–209.
5. Innocentia G., Vegetob E., Dall-Acqua S. et al. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. // Phytomedicine. 2007/ 14. P. 147–152.
6. Potrich F.B., Allemand A., da Silva L.M. et al. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L. involvement of the antioxidant system. // J. of Ethnopharmacology. 2010. 130. P. 85–92.
7. Babaei M., Abarghoei M.E., Akhavan M.M. et al. Antimotility effect of hydroalcoholic extract of yarrow (*Achillea millefolium*) on the Guinea-Pig Ileum, Pakistan. // J. of Biol. Sci. 2010. 10 (20). P. 3673–3677.
8. Yassa N., Saeidnia S., Pirouzi R. et al. Three phenolic glycosides and immunological properties of *Achillea millefolium* from Iran, population of Golestan. // DARU. 2007. 15 (1). P. 49–52.
9. Hemmati A.A., Arzi A., Adinehvand A. et al. Yarrow (*Achillea millefolium* L.) extract impairs the fibrogenic effect of bleomycin in rat lung // J. of Med. Plants Res. 2011. 5(10). P. 1843–1849.

10. Сухенко Л.Т. Перспективы выделения противомикробных биологически активных веществ из некоторых дикорастущих растений Астраханской области // Вестник Оренбургского государственного университета. 2011. 123. С. 98–102.

11. Kharma A., Hassawi D. The Antimicrobial activity and genetic relationship of *Achillea* species // Biotechnology. 2006. 5(4). P. 501–507.

12. Santanna J.R.de, Franco C.C., Miyamoto C.T. et al. Genotoxicity of *Achillea millefolium* essential oil in diploid cells of *Aspergillus nidulan*, // Phytotherapy Research. 2009. 23. P. 231–235.

13. Souza T.M., Rangel V.L.B., Rr. Pietro R.C.L. et al. Phytochemical screening of *Achillea millefolium* harvested at Araraquara // Sp, R. Brasileira de Plantas Medicinaiis. 2006. 8. P. 151–154.

14. Mahmoud A.A., Al-Shihry S.S., Hegazy M.-E. F. A new epimeric sesquiterpene lactone from *Achillea ligustica* // Records of natural products. 2012. 6(1). P. 21–27.

15. Toncer O., Basbag S., Karaman S. et al. Chemical composition of essential oils of some *Achillea* species growing wild in Turkey // Inter. J. Agricul. and Biol. 2010. 12. P. 527–530.

16. Krenn L., Miron A., Pemp E. et al. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. // Z. Naturforsch. 2003. 58. P. 11–26.

17. Benetis R., Radusiene J., Janulis V. Variability of phenolic compounds in flowers of *Achillea millefolium* Wild populations in Lithuania // Medicina (Kaunas). 2008. 44(10). P. 775–781.

18. Lakshimi T., Geetha R.V., Roy A.A. et al. Yarrow (*Achillea millefolium* Linn.) a herbal medicanl plant with broad therapeutic use – a reiew. // Intern. J. Pharm. Sci. Review and Research. 2011. 9(2). P. 136–141

УДК 543; 543.2; 543.6

Беляев А.П.^{1,2}, Мохоров Д.А.²

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет¹, Россия, Санкт-Петербург

ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого², Россия, Санкт-Петербург
Alexei.Belyaev@pharminnotech.com

Повышение объективности анализа в аналитической химии

С целью демонстрации возможностей сличительных испытаний представлены результаты межлабораторных сличительных испытаний экспериментальных лабораторий, осуществлявших анализ водки, производимой и реализуемой на территории Российской Федерации для употребления в пищу.

Ключевые слова: лекарственные вещества, пищевые продукты, методы повышения качества лекарственных веществ, повышение компетентности экспериментальных лабораторий, межлабораторные сличительные испытания, математические методы анализа, нормативная база межлабораторных сличительных испытаний.

*A.P. Belyaev^{1,2}, D.A. Mokhorov²
St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University¹,
Russia, St. Petersburg*

Increasing the objectivity of analysis in analytical chemistry

The results of the interlaboratory comparison tests of experimental laboratories that analyzed vodka produced and sold in the Russian Federation for human consumption are presented in order to demonstrate the capabilities of the comparison tests.

Key words: medicinal substances, food products, methods for improving the quality of medicinal substances, improving the competence of experimental laboratories, interlaboratory comparison tests, mathematical methods of analysis, regulatory framework for interlaboratory comparison testing.

Введение. Разработка новых лекарств, лекарственных форм [1-4], вступление в силу новых законодательных актов в области обращения лекарственных средств [5] диктует поиск новых современных подходов к контролю их качества. Одним из возможных путей к повышению качества лекарственных веществ может стать введение в практику межлабораторных сличительных испытаний (МСИ), эффективность которых доказана их широким применением в пищевой промышленности. В связи с этим, для демонстрации возможностей МСИ, ниже представлены результаты межлабораторного эксперимента при проведении испытаний водки, производимой на территории Российской Федерации в соответствии с ГОСТ 12712-2013 «Водки и водки особые. Общие технические условия» [6]. Межлабораторный сличительный эксперимент реализован в соответствии с ГОСТ Р ИСО 13528 «Статистические методы. Применение при экспериментальной проверке компетентности посредством межлабораторных сравнительных испытаний» [7]. Выбор объекта исследований определялся его относительной близостью к лекарственным веществам.

Материалы и методы. При выборе участников МСИ руководствовались принципом использования в своей деятельности одинаковых

нормативных документов. В настоящей работе участники руководствовались нормативными документами, представленными в табл. 1 [8, 9].

Таблица 1. Перечень нормативных документов, используемых участниками межлабораторных сличительных испытаний

Контролируемый показатель	Нормативный документ
Крепость	ГОСТ 32035-2013 (п. 5.3.1) [8]
Щелочность	ГОСТ 32035-2013 (п. 5.4) [8]
Массовая концентрация уксусного альдегида	ГОСТ 30536-2013 [9]
Массовая концентрация сивушного масла	ГОСТ 30536-2013 [9]
Массовая концентрация сложных эфиров (метилацетат, этилацетат)	ГОСТ 30536-2013 [9]
Объемная доля метилового спирта в пересчете на безводный спирт	ГОСТ 30536-2013 [9]

Участники МСИ могли самостоятельно выбрать вид испытаний и принять участие в МСИ только по испытаниям, внедренным в практику лаборатории. Всего в МСИ было зарегистрировано 30 испытательных лабораторий.

Объектом испытаний выбрана Водка “Tundra Authentic. Водка Крайнего Севера”, крепость 40%об; срок годности не ограничен при соблюдении условий хранения и транспортирования, расфасованная в бутылки стеклянные объёмом 0,7 л, укупоренные комбинированной пробкой и термоусадочным колпачком. Каждый участник эксперимента получил по одной бутылке водки “Tundra Authentic. Водка Крайнего Севера”. Объект испытаний был соответствующим образом подготовлен для применения в данном раунде МСИ, упакован и маркирован.

Состав водки, выбранной в качестве объекта для испытаний: вода питьевая исправленная, спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья “Альфа”, сахарный сироп, настой спиртованный пантов марала, ароматизатор натуральный.

Подготовленные образцы для МСИ хранили до отправки Участникам в условиях, установленных изготовителем, а именно при температуре от -15°С до + 30°С, относительной влажности не более 85 %.

Выбранные случайным образом образцы для МСИ были переданы в лабораторию для проведения испытаний и получения результатов с целью подтверждения однородности и стабильности объекта испыта-

ний. Проведены испытания образцов для МСИ в условиях повторяемости.

С целью проверки однородности и стабильности выбраны следующие показатели: крепость по ГОСТ 32035-2013 [8], массовая концентрация сивушного масла по ГОСТ 30536-2013 [9].

Проверка однородности и стабильности объекта испытаний проводилась в соответствии с ГОСТ Р ИСО 13528 (п. 4.4) [7]. Установлена однородность и стабильность объекта испытаний по выбранным показателям.

Образцы для МСИ были переданы 30 зарегистрированным Участникам МСИ в сопровождении задания на проведение испытаний [10-13]. Результаты испытаний, полученные от Участников, обрабатывались по согласно методике: ГОСТ Р ИСО-МЭК 5725-2-2002 [14-19].

Приписанные значения контролируемых показателей получены в соответствии с п.5.2.1 ГОСТ Р ИСО 13528 [7] как средние арифметические значения результатов измерений, представленных Участниками МСИ.

Все результаты, полученные в эксперименте $x=x_i$, проверялись на наличие выбросов с использованием критерия Граббса (п. 5.1 ГОСТ Р ИСО 13528 [7] и п. 7.3.4 ГОСТ Р ИСО 5725-5 [18]). Критические значения для критерия Граббса представлены в табл. 2.

Согласно статистики Граббса экспериментальные результаты x_i ($i=1, 2, \dots, p$) располагались в вариационный ряд, а затем для проверки, не является ли выбросом наибольшая величина $x_{max}=x_p$, вычисляли статистику Граббса G_p по формуле:

$$G_p = (x_{max} - X)/s$$

Для проверки значимости наименьшего результата $x_{min}=x_1$ наблюдения вычисляли статистику Граббса G_1 по формуле:

$$G_1 = (X - x_{min})/s$$

где X – среднее значение результатов измерений,

$$s = \sqrt{\frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (x_i - X)^2}$$

Таблица 2. Критические значения критерия Граббса

p	Одно наибольшее или одно наименьшее	
	свыше 1%	свыше 5%
12	2,636	2,412
16	2,852	2,585
17	2,894	2,620
21	3,031	2,733
22	3,060	2,758
29	3,218	2,893

Вычисленное значение G_p сравнивали с данными табл. 2. Если G_p оказывалось меньше числа, представленного во второй колонке строки соответствующей числу членов вариационного ряда, результат признавался корректным. В противном случае результат признавался выбросом, и он отбрасывался, а расчеты повторялись, но с меньшим числом членов вариационного ряда ($p - 1$).

Аналогичным образом проверяли значимость наименьшего результата, используя критерий Граббса G_l .

После исключения выбросов новое среднее арифметическое значение \bar{X} принимали в качестве приписанного значения для определения стандартного отклонения оценки компетентности и вычисления статистик, характеризующих работу лабораторий.

Стандартная неопределенность [20, 21] приписанного значения u_x рассчитывалась по формуле:

$$u_x = \frac{1,25}{p} \sqrt{\sum_{i=1}^p u_i^2}$$

где u_x неопределённость результата, представленная участником МСИ.

Приписанные значения \bar{X} и их стандартная неопределенность u_x приведены в табл.3.

Оценка стандартного отклонения компетентности $\hat{\sigma}$ проведена в соответствии с п. 6.2.1, п. 6.5.1 ГОСТ Р ИСО 13528 [7].

При статистической обработке в первую очередь рассчитывали стандартное отклонение воспроизводимости σ_R и стандартное отклонение повторяемости σ_r :

$$\sigma_R = \frac{R}{2,8} \quad \sigma_r = \frac{r}{2,8}$$

где R и r критерии воспроизводимости и повторяемости, соответственно, определяемые методикой измерения, использованной лабораторией Участником.

Межлабораторное стандартное отклонение вычисляли по формуле:

Оценка качества проведения испытаний участниками МСИ в об-

$$\sigma_L = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2} \quad \text{и, соответственно} \quad \hat{\sigma} = \sqrt{\sigma_L^2 - (\sigma_r^2/2)}$$

ласти контроля качества водки произведена в соответствии с п. 7.4 ГОСТ Р ИСО 13528 [7] с использованием величины z-индекса, вычисленного по формуле:

$$z = \frac{X_i - X}{\hat{\sigma}}$$

Таблица 3. Приписанные значения и их стандартная неопределенность

Контролируемый показатель	Единица измерения	p*	Приписанное значение, X	Стандартная неопределенность приписанного значения, ux
Крепость	%	29	39,9	0,02
Щелочность	см ³ /100 см ³	12	0,1	0,04
Массовая концентрация уксусного альдегида	мг/дм ³	17	1,2	0,05
Массовая концентрация сивушного масла	мг/дм ³	22	1,0	0,04
Объемная доля метилового спирта в пересчете на безводный спирт	%	21	1*10-4	5*10-6

Результаты и их обсуждение. Результаты оценки компетентности Участников МСИ в области контроля качества водки с использованием z-индекса приведены на диаграммах (рис. 1-5). Интерпретация z-индекса в соответствии с п. 7.4.2 ГОСТ Р ИСО 13528 [7] приводится в табл. 4. Номера участников выбраны случайным образом.

Таблица 4. Интерпретация z-индекса в соответствии с п. 7.4.2 ГОСТ Р ИСО 13528 [7]

Z-индекс	Интерпретация z-индекса	Оценка качества проведения испытания в лаборатории
$-2 \leq z \leq 2$	---	Удовлетворительно
$-3 \leq z < -2$ $2 < z \leq 3$	«предупреждающий сигнал»	Сомнительно
$3 < z < -3$	«сигнал к действию»	Неудовлетворительно

Большинство участников МСИ успешно справились с задачей испытания водки в условиях воспроизводимости аналитического метода.

При оценке крепости 72% участников получили удовлетворительные оценки ($-2 \leq z \leq 2$), 4% получили «предупреждающий сигнал» ($-3 \leq z < -2$; $2 < z \leq 3$), т.е. их деятельность была оценена как «сомнительная» и 24% получили «сигнал к действию» ($3 < z < -3$), т.е. не справились с поставленной задачей и их деятельность оценена как неудовлетворительная.

При определении щелочности 92% участников получили удовлетворительные оценки ($-2 \leq z \leq 2$), и 8% получили «сигнал к действию» ($3 < z < -3$), т.е. не справились с поставленной задачей и их деятельность оценена как неудовлетворительная.

При определении массовой концентрации уксусного альдегида 41% участников получили удовлетворительные оценки ($-2 \leq z \leq 2$), 18% получили «предупреждающий сигнал» ($-3 \leq z < -2$; $2 < z \leq 3$), т.е. их деятельность была оценена как «сомнительная» и 41% получили «сигнал к действию» ($3 < z < -3$), т.е. не справились с поставленной задачей и их деятельность оценена как неудовлетворительная.

При определении массовой концентрации сивушного масла 64% участников получили удовлетворительные оценки ($-2 \leq z \leq 2$), 27% получили «предупреждающий сигнал» ($-3 \leq z < -2$; $2 < z \leq 3$), т.е. их деятельность была оценена как «сомнительная» и 9% получили «сигнал к действию» ($3 < z < -3$), т.е. не справились с поставленной задачей и их деятельность оценена как неудовлетворительная.

При определении объемной доли метилового спирта 86% участников получили удовлетворительные оценки ($-2 \leq z \leq 2$), 5% получили «предупреждающий сигнал» ($-3 \leq z < -2$; $2 < z \leq 3$), т.е. их деятельность была оценена как «сомнительная» и 10% получили «сигнал к действию» ($3 < z < -3$), т.е. не справились с поставленной задачей и их деятельность оценена как неудовлетворительная.

Наилучших результатов Участники добились при определении щелочности (92%) и объемной доли метилового спирта (86%)

Небольшие проблемы вызвало определение массовой концентрации уксусного альдегида; его содержание корректно смогли определить лишь 41% Участников.

Участник под номером 30 не справился с тремя из пяти заданий.

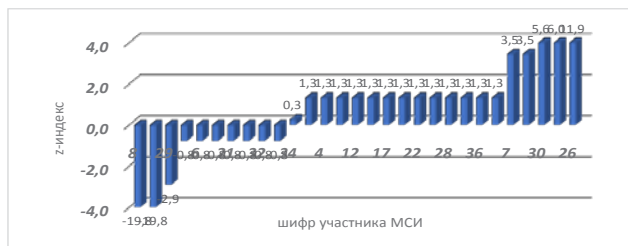


Рис. 1. Диаграмма, визуально демонстрирующая проверки на качество испытаний при определении крепости (%) по ГОСТ 32035, п. 5.3.1 [8] в водке

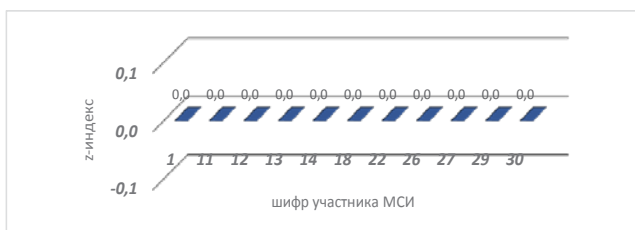


Рис. 2. Диаграмма, визуально демонстрирующая проверки на качество испытаний при определении щелочности (см³/100 см³) по ГОСТ 32035, п. 5.4 [8] в водке

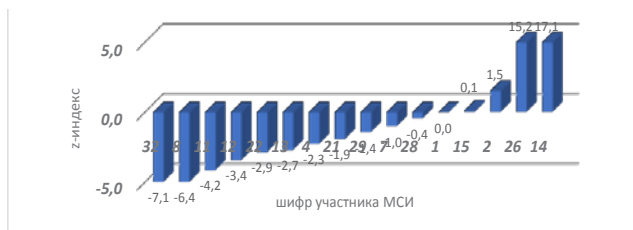


Рис. 3. Диаграмма, визуально демонстрирующая проверки на качество испытаний при определении массовой концентрации уксусного альдегида (мг/дм³) по ГОСТ 30536 [9] в водке

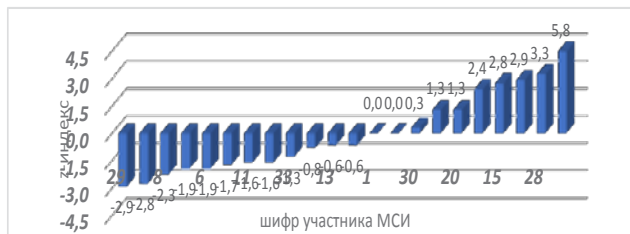


Рис. 4. Диаграмма, визуально демонстрирующая проверки на качество испытаний при определении массовой концентрации сивушного масла (мг/дм³) по ГОСТ 30536 [9] в водке

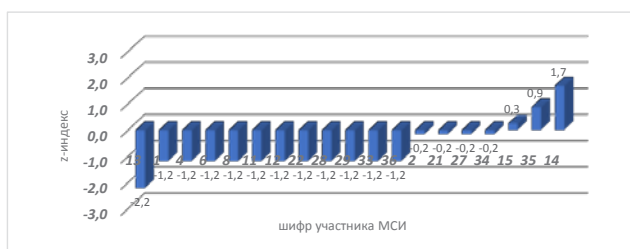


Рис. 5. Диаграмма, визуально демонстрирующая проверки на качество испытаний при определении объемной доли метилового спирта в пересчете на безводный спирт (%) по ГОСТ 30536 [9] в водке

Заключение

1. Межлабораторные сличительные испытания позволяют корректно и наглядно оценить компетентность экспериментальных лабораторий.
2. Межлабораторные сличительные испытания позволяют планировать действия предупреждающие нарушения объективности в работе экспериментальных лабораторий.
3. Введение в практику работы экспериментальных лабораторий, работающих в сфере производства и обращения лекарственных веществ, межлабораторных сличительных испытаний, может стать одним из возможных путей к повышению качества лекарственных веществ.
4. Для апробирования межлабораторных сличительных испытаний в сфере производства и обращения лекарственных веществ можно воспользоваться нормативной базой, разработанной для пищевых продуктов.

Список литературы

1. *Беляев А.П., Рубец В.П., Антипов В.В.* Калориметрическое получение лекарственной формы парацетамола // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. №2 (19). С.62-64.
2. *Беляев А.П., Рубец В.П., Антипов В.В.* Устойчивость лекарственной формы парацетамола, сформированной на основе молекулярных кристаллов ромбической модификации // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. №1 (22). С.30-32.
3. *Беляев А.П., Рубец В.П., Антипов В.В., Bordei N.S.* Особенности формирования структуры молекулярных кристаллов при вакуумном синтезе парацетамола. // Журнал физической химии. 2015. №4 (89). С. 586-591.
4. *Беляев А.П., Рубец В.П., Антипов В.В.* Влияние температуры на ромбическую форму молекулярных кристаллов парацетамола. // ЖТФ. 2017. №.4(87). С.624-626.
5. Приказ Минздрава России от 13.02.2013 №66 (ред. от 07.04.2016) «Об утверждении Стратегии Лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации».
6. Межгосударственный стандарт, принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 7 июня 2013 г. N 43), ГОСТ 12712-2013 Водки и водки особые. Общие технические условия
7. Национальный стандарт Российской Федерации, утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 ноября 2010 г. N 440-ст, ГОСТ Р ИСО 13528 Статистические методы. Применение при экспериментальной проверке компетентности посредством межлабораторных сравнительных испытаний
8. Межгосударственный стандарт, принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 07 июня 2013 г. N 43), ГОСТ 32035-2013 Водки и водки особые. Правила приемки и методы анализа.
9. Межгосударственный стандарт, принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 7 июня 2013 г. N 43), ГОСТ 30536-2013 Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический экспресс-метод определения содержания токсичных микропримесей
10. Межгосударственный стандарт, принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации по переписке (протокол от 19 мая 2013 г. N 56-П), ISO/IEC 17043-2013 Оценка соответствия. Основные требования к проведению проверки квалификации.

11. Рекомендации по межгосударственной стандартизации, приняты Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 ноября 2010 г. N 38), РМГ 103-2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Проверка квалификации испытательных (измерительных) лабораторий, осуществляющих испытания веществ, материалов и объектов окружающей среды (по составу и физико-химическим свойствам) посредством межлабораторных сравнительных испытаний.

12. Рекомендации по межгосударственной стандартизации, приняты Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 июня 2014 г. N 45), РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа

13. Рекомендации по межгосударственной стандартизации, приняты Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 23 от 22 мая 2003 г.), РМГ 58—2003 Государственная система обеспечения единства измерений. Оценка качества работы испытательной лаборатории пищевых продуктов и продовольственного сырья. Методика внешнего контроля точности результатов испытаний

14. Государственный стандарт Российской Федерации, принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 23 апреля 2002 г. N 161-ст, ГОСТ Р ИСО-МЭК 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

15. Государственный стандарт Российской Федерации., принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 23 апреля 2002 г. N 161-ст, ГОСТ Р ИСО-МЭК 5725-2-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

16. Государственный стандарт Российской Федерации, принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 23 апреля 2002 г. N 161-ст, ГОСТ Р ИСО-МЭК 5725-3-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений.

17. Государственный стандарт Российской Федерации, принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 23 апреля

2002 г. N 161-ст, ГОСТ Р ИСО-МЭК 5725-4-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений

18. Государственный стандарт Российской Федерации, принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 23 апреля 2002 г. N 161-ст, ГОСТ Р ИСО-МЭК 5725-5-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 5. Альтернативные методы определения прецизионности стандартного метода измерений].

19. Государственный стандарт Российской Федерации, принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 23 апреля 2002 г. N 161-ст, ГОСТ Р ИСО-МЭК 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

20. Национальный стандарт Российской Федерации, утвержден и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 27 января 2004 г. N 34-ст, ГОСТ Р ИСО 16269-7-2004 Статистические методы. Статистическое представление данных. Медиана. Определение точечной оценки и доверительных интервалов.

21. Рекомендации по межгосударственной стандартизации, приняты Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 20 от 2 ноября 2001 г.), РМГ 43-2001 Государственная система обеспечения единства измерений. Применение “Руководства по выражению неопределенности измерений”.

УДК 577.29

*Васильева Н.Г., Козлова-Козыревская А.Л., Мицкевич Е.Н.
Белорусский государственный педагогический университет
Республика Беларусь, Минск
ogeiko@rambler.ru*

β , β' -Трикарбонильный фрагмент как синтон лекарственных препаратов

В статье изложены схемы синтеза веществ, проявляющих терапевтическое действие. В основе структуры подобных соединений лежит β, β' -трикарбонильный фрагмент, являющийся блоком-синтоном для синтеза ряда антибиотиков, простагландинов, 8-азастероидов.

Ключевые слова: β,β' -трикарбонильный фрагмент, глутаримидные антибиотики, простагландины.

Vasilyeva N.H., Kozlova-Kozyrevskaya A.L., Mitskevich E.N.
Belarusian state pedagogical university named after Maxim Tank
Belarus, Minsk

β, β' - Tricarbonyl moiety as a synthon of drugse

The article describes schemes for the synthesis of substances that exhibit a therapeutic effect. The structure of such compounds is based on the β,β' -tricarbonyl fragment, which is a synthonic block for the synthesis of a number of antibiotics, prostaglandins, 8-azasteroids.

Key words: β,β' -tricarbonyl fragment, glutarimide antibiotics, prostaglandins.

На современном этапе развития общества синтез органических веществ, обладающих различным видом биологической активности (в том числе, обладающих лечебным эффектом), занимает одно из ведущих задач прикладной органической и биоорганической химии.

Так, известно, что циклический β,β' -трикарбонильный фрагмент (рис. 1) в той или иной модификации входит в состав многих природных биологически активных соединений, продуцируемых микроорганизмами, растениями, насекомыми [1–3].

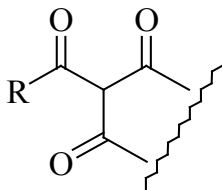


Рис. 1. Циклический β,β' -трикарбонильный фрагмент

Благодаря полифункциональности β,β' -трикарбонильной системы 2-ацилциклоалкан-1,3-дионы и их гетероциклические аналоги широко используются в качестве универсальных блоков в различных схемах полного синтеза ряда биорегуляторов: антибиотиков, простаноидов, фитопростанов, 8-азастероидов и др. [4].

Так, показана возможность препаративного синтеза циклогексановых β,β' -трикетонов общей формулы **2** (рис. 2), являющихся предшественниками и аналогами глутаримидных антибиотиков, в результате взаимодействия хлорангидрида β -глутаримидилуксусной

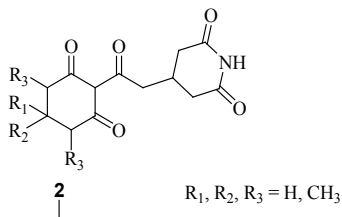


Рис. 2. Циклический β,β' -трикарбонильный фрагмент, предшественник глутаримидных антибиотиков

кислоты с различными diketонами (5,5-диметилциклогексан-1,3-дионом, циклогексан-1,3-дионом, 5-метилциклогексан-1,3-дионом и 4,6-диметилциклогексан-1,3-дионом) в хлороформе в присутствии пиридина (с практически количественными выходами) и последующей O-C-изомеризации образующихся енолэфиров с использованием в качестве катализатора хлористого алюминия (выход – 84-90%) либо ДМАП (выходы 95-98%) [5].

В работе [6] предложен синтез новых цис-диамминоплатиновых комплексов **5**, в которых в качестве бидентатных ацидолигандов выступают производные 2-ацилциклогексан-1,3-дионов (рис. 3). Синтез осуществлен путем превращения цис-диамминдидиодоплатины (II) **3** под действием сульфата серебра в цис-диамминсульфатоплатину (II) **4** с последующей обработкой гидроксидом бария и взаимодействия полученного основания с двухкратным избытком трикарбонильного соединения.

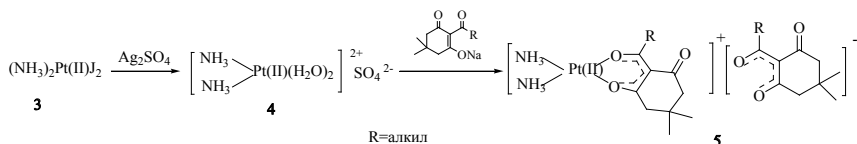


Рис. 3. Общая формула цис-диамминоплатиновых комплексов

Данное направление работы является перспективным для получения противоопухолевых препаратов на основе координационных соединений платины [7].

Поиску и синтезу веществ, а также их аналогов с выраженным терапевтическим эффектом занимаются ученые нашего университета на кафедре химии, химического факультета БГУ, а также ряда учреждений АН Беларуси (например, Институт биоорганической химии НАН Беларуси).

Список литературы

1. Лахвич Ф. А. Циклические β -трикетоны в природе. Выделение, структура и биологическая активность / Ф.А. Лахвич, Т.С. Хлебникова // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук. 1996. № 4. С. 101-119.
2. Рубинов Д. Б. 2-Ацилциклоалкан-1,3-дионы: нахождение в природе, биологическая активность, биогенез, химический синтез / Д. Б. Рубинов, И. Л. Рубинова, А. А. Ахрем // Химия природных соединений. 1995. № 5. С. 635-663.
3. Васильева Н.Г. [и др.]. Синтез циклических трикетонов – исходных реагентов для получения циклических аминов // Инновационные процессы в науке и технике XXI века: материалы XVI межд. конф. Тюмень : ТИУ, 2018. Т. 2. С. 65-69.
4. Schmidt A. General strategy for the synthesis of B₁ phytoprostanes, dinor isoprostanes, and analogs / A. Schmidt, W. Boland // J. of Organic Chemistry – 2007. Vol. 72, № 5. P. 1699-1706.
5. Лахвич Ф. А. 2-(β -Глутаримидилацетил)-циклогексан-1,3-дионы – новые аналоги и синтетические предшественники глутаримидных антибиотиков / Ф. А. Лахвич, Т. Н. Буравская, А. А. Ахрем // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук. 1992. № 2. С. 77-83.
6. Хлебникова Т. С. Синтез координационных соединений платины (II) с производными 2-ацилциклоалкан-1,3-дионов в качестве ацидолиганда / Т. С. Хлебникова, И. В. Меркушин, Ф. А. Лахвич // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук. 2004. Т. 2. С. 110-143.
7. Current status of platinum-based antitumor drugs / С. М. Giandomenico [et al.] // Chemical Reviews. 1999. Vol. 99, № 9. P. 2451-2466.

УДК.541.49.183:546.562.;723:547.854.5

*Васильева П.А., Дмитриева И.Б., Чухно А.С.
ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет (СПХФУ)
Россия, Санкт-Петербург
polina.vasileva@spcru.ru*

**Исследование поверхностно-активных веществ,
гидрофильно-липофильного баланса и критической концентрации
мицеллообразования**

В статье рассматривается определение критической концентрации мицеллообразования для различных по природе поверхностно-активных

веществ методами поверхностного натяжения, рефрактометрическим и электрохимическим. Изучена стабильность эмульсий.

Ключевые слова: *поверхностно-активные вещества, гидрофильно-липофильный баланс, критическая концентрация мицеллообразования.*

*Vasileva P.A., Dmitriyeva I.B., Chukhno A.S.
Saint Petersburg Chemical Pharmaceutical University
Russia, St. Petersburg*

Study of surfactants, hydrophilic-lipophilic balance and critical concentration of miceloid formation

The article considers the determination of the critical concentration of micelle formation for various surfactants by surface tension, refractometric and electrochemical methods. The stability of emulsions was studied.

Key words: *surfactants, hydrophilic-lipophilic balance, critical concentration of micelle formation.*

Эмульсией называется коллоидная высокодисперсная система, в которой дисперсная фаза и дисперсионная среда являются несмешивающимися жидкостями [1].

Актуальность. В медицинской и фармацевтической отрасли эмульсии нашли широкое применение: многие биологические жидкости человека имеют эмульсионный тип (кровь, лимфа и др.), существует большое количество препаратов эмульсионного типа. Так как эмульсионные системы являются нестабильными, подбор соответствующего данной эмульсии эмульгатора в нужном количестве является важной задачей фармации [2, 3].

Целью данной работы является: исследование процесса стабилизации эмульсий, содержащих различные поверхностно-активные вещества (ПАВы).

В качестве эмульгаторов могут применяться самые различные по природе вещества: ПАВы, молекулы которых содержат ионогенные полярные группы, неионогенные ПАВы, высокомолекулярные соединения (ВМС). Анионоактивные ПАВ имеют щелочные полярные группы: рН таких эмульсий колеблется в пределах 9–13. Катионоактивные ПАВ имеют кислотные полярные группы: рН таких эмульсий колеблется в пределах 2–6.

Стабилизация эмульсии с помощью ПАВ обеспечивается благодаря адсорбции и определенной ориентации молекулы ПАВ, что вызывает понижение поверхностного натяжения. Кроме этого ПАВы с длинными радикалами на поверхности капелек могут образовывать пленки значительной вязкости.

Растворимость ПАВ характеризуется гидрофильно-липофильный балансом (ГЛБ). Чем это число больше, тем сильнее баланс смещен в сторону гидрофильных свойств, тем лучше данное вещество растворяется в воде. Растворимые в воде ПАВ с ГЛБ от 8 до 13 хорошо стабилизируют прямые эмульсии типа масло/вода. Для стабилизации обратных эмульсий типа вода/масло подходят ПАВ с более низким ГЛБ – от 3 до 7.

Работа является частью работ направленных на изучение коллоидных свойств биологически активных веществ [4-6]

Объектами исследования являлись ПАВ разной природы. В работе изучались следующие ПАВы: лаурилсульфат натрия $C_{12}H_{25}SO_4Na$, неонол $C_{15}H_{24}O(C_2H_4O)_n$, кокамидопропилбетаин $C_{19}H_{38}N_2O_3$.

Определение критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Данная величина характеризует минимальную концентрацию ПАВ, при которой происходит стабилизация эмульсии. ККМ определяли для ионных и неионных ПАВ методами поверхностного натяжения, рефрактометрическим и электрохимическим.

Метод поверхностного натяжения. Поверхностное натяжение определяли с помощью прибора Дю Нуи, методом отрыва кольца. В стандартную чашку Петри наливали исследуемый раствор, настраивали прибор по воде и проводили трехкратные испытания. ККМ эмульгаторов определяли как излом кривой.

ККМ лаурилсульфата соответствует $0,0010 \pm 0,0002$ моль/л (рис. 1).

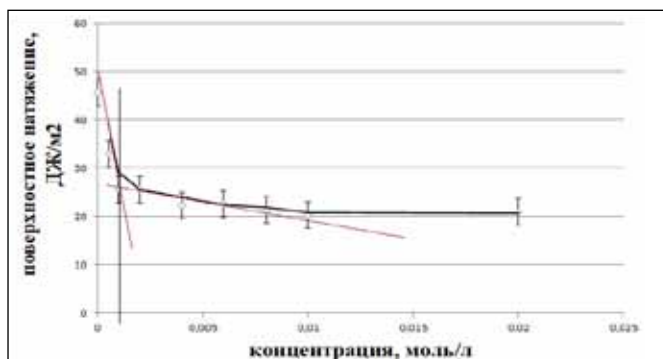


Рис. 1. Зависимость поверхностного натяжения от концентрации лаурилсульфата

ККМ кокаמידопропилбетаина соответствует $0,0015 \pm 0,0002$ моль/л (рис. 2)

ККМ неонола соответствует $0,00012 \pm 0,00005$ моль/л (рис. 3).

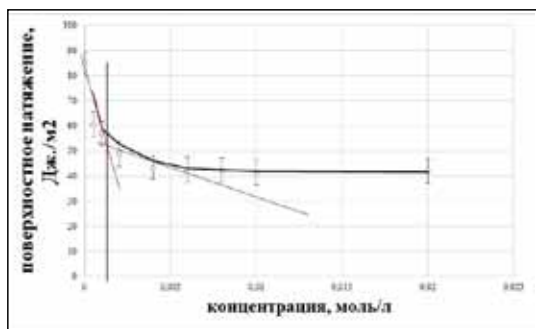


Рис. 2. Зависимость поверхностного натяжения от концентрации кокаמידопропилбетаина

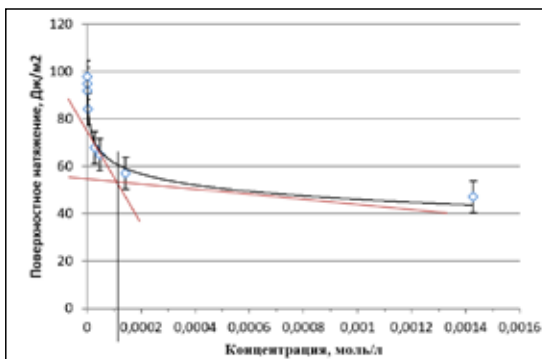


Рис. 3. Зависимость поверхностного натяжения от концентрации неонола

Метод рефрактометрии. Угол преломления определяли для лаурилсульфата натрия (рис. 4) с помощью рефрактометра Аббе. Между призмами рефрактометра помещали небольшое количество (1-2 капли) анализируемой жидкости, и производили настройку прибора путем регулирования компенсатора. ККМ для лаурилсульфата соответствует $0,0015 \pm 0,0002$ моль/л.

Метод спектрофотометрии. Снятие спектров поглощения производили для раствора неонола на спектрофотометре СФ-2000 в кюветках длиной 10 мм относительно чистого растворителя в ультрафиолетовой области (рис. 5).

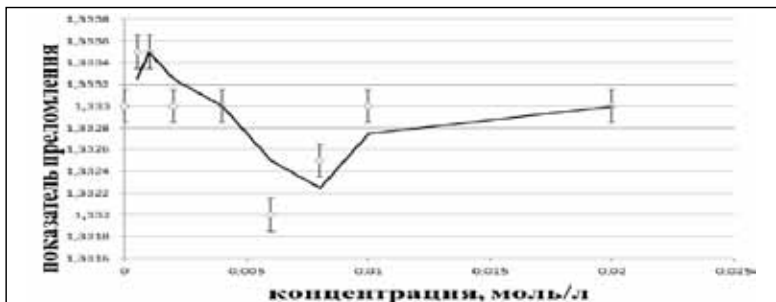


Рис. 4. Зависимость показателя преломления от концентрации лаурилсульфата натрия

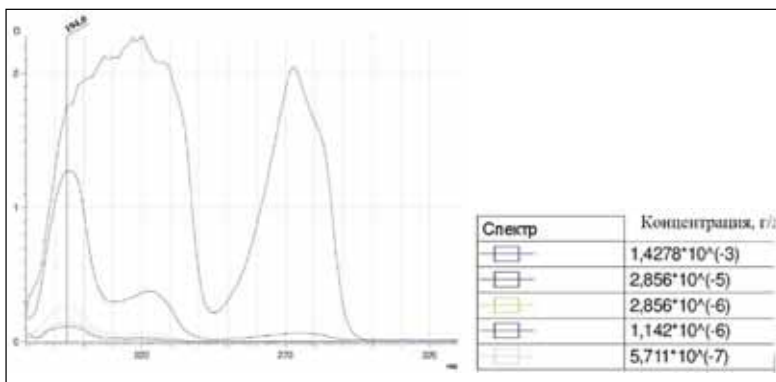


Рис. 5. Спектры поглощения растворов неона

На спектрах наблюдается растущий пик в области 194 ± 5 нм. Был построен график зависимости оптической плотности растворов от концентрации неона (рис. 6). ККМ неона составил $0,00011 \pm 0,00002$ моль/л.

Изучение устойчивости эмульсии. Была изучена стабильность эмульсий во времени. Расслоение наблюдали визуально. Исследовалась прямая эмульсия вода-гептан. Эмульсии были получены с расчетом ГЛБ смеси, было принято целевое ГЛБ=15.

Далее были получены эмульсии с разным соотношением фаз. Первую серию эмульсий стабилизировали добавлением 0,1 мл неона (0,009 г/л). Вторую серию стабилизировали таким же количеством неона с добавлением со-эмульгатора лаурилсульфата натрия (0,05 г/л). Результаты испытания представлены в табл. 1.

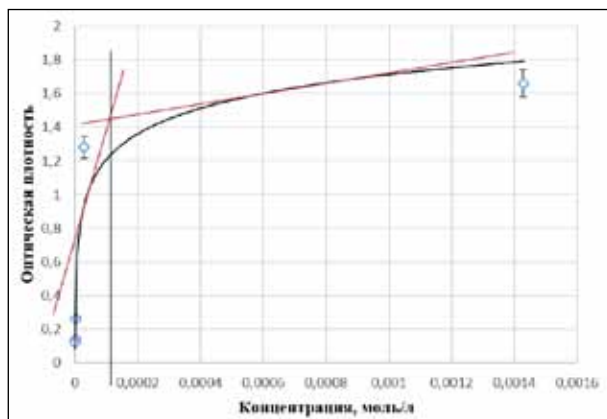


Рис. 6. Зависимость оптической плотности растворов от концентрации ненола

Таблица 1. Испытание стабильности эмульсий

	Эмульсия состава, %		время расслоения эмульсии, с	
	вода	гептан	с одним ПАВ	с двумя ПАВ
1	5	45	7913	10839
2	10	40	5866	8360
3	20	30	3660	4894
4	30	20	1241	1622
5	40	10	491	1185

Испытание показало, что сочетание двух ПАВ наиболее оптимально при стабилизации эмульсии.

Вывод. В ходе работы было определено, что наиболее оптимальный метод определения ККМ является метод поверхностного натяжения. ККМ, определяемая методом отрыва кольца, для лаурилсульфата натрия составляет $0,0010 \pm 0,0002$ моль/л, кокамидпропилбетаина – $0,0015 \pm 0,0002$ моль/л, ККМ ненола – $0,00012 \pm 0,00005$ моль/л. ККМ для лаурилсульфата, определяемая рефрактометрическим методом, соответствует $0,0015 \pm 0,0002$ моль/л. ККМ ненола, определяемая спектрофотометрическим методом, соответствует $0,00011 \pm 0,00002$ моль/л, что близко по значению, определяемому методом поверхностного натяжения.

Изучение стабильности эмульсии показало, что наиболее эффективно стабилизирует эмульсии комбинация эмульгаторов с различным значением ГЛБ.

Список литературы

1. Беляев, А.П. Физическая и коллоидная химия: учебник 2-е издание / Беляев А.П., Кучук В.И. -Москва, издательство группа «ГЭО-ТАР-Медиа», 2012 г. 752 с.
2. Позднякова Т. А., Пучкова О. М. Изучение влияния различных эмульгаторов на качество эмульсий экстемпорального изготовления. Вестник ВГУ, серия: химия. Биология. Фармация – № 2 – 2019 – С.102-108
3. Цымбалов А.С. влияние поверхностно-активных веществ на диспергирование и стабильность водомасляных эмульсий. Современные наукоемкие технологии. Региональное положение – №3 – 2018 – С.108 – 119
4. Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Мартынов Д.В. Влияние солей одно-, двух- и трехзарядных катионов металлов на сорбцию H^+ И OH^- ионов на декстране. Бутлеровские сообщения. 2011. Т. 27. № 14. С. 47-54.
5. Чухно А.С., Банкина А.Н., Бриллиантова Е.Ю. Кинетика процесса набухания желатины в водных растворах азолов. Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 38. № 5. С. 84-88.
6. Дмитриева И.Б., Чухно А.С., Родионова Е.Ю., Назипова А.Р. Коллоидные свойства водных дисперсий декстрана. Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 42. № 5. С. 98-103.

УДК 615.322

Горбачевич Г.И., Шадыро О.И.
Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, Минск
hleb.harbatsevich@gmail.com

Антиоксидантная активность сухих экстрактов растений рода *Galium*

*В работе изучена антиоксидантная активность экстрактов из растений рода Подмаренник. Показано, что сухие экстракты *Gallium verum* и *Gallium mollugo*, способны эффективно ингибировать свободно-радикальные процессы с участием ДФПГ-радикала, NO , O_2^- , H_2O_2 (IC_{50} 12,1–13,0; 199,4–222,3; 270,0–290,0; 1860–1970 мкг/мл соответственно).*

Ключевые слова: *Gallium verum*, *Gallium odoratum*, *Gallium mollugo*, *Galium aparine*, антиоксидантная активность.

Harbatsevich H.I., Shadyro O.I.
Belarusian State University
Belarus, Minsk

Antioxidant activity of dry extracts of plants from genus *Galium*

Antioxidant activity of extracts from plants of the genus Bedstraw has been studied in the work. It has been shown that dry extracts of Gallium verum and Gallium mollugo are able to inhibit effectively free radical processes with the participation of DPPH radical, NO, O²⁻, H₂O₂ (IC₅₀ 12.1-13.0; 199.4-222.3; 270, 0-290,0; 1860-1970 µg/ml, respectively).

Key words: *Gallium verum*, *Gallium odoratum*, *Gallium mollugo*, *Galium aparine*, antioxidant activity.

Введение. Род Подмаренник (*Galium*), состоящий из более 1000 видов, относится к семейству Мареновые (*Rubiaceae*), и широко распространен во всем мире [1]. Многие виды подмаренника используются в народной медицине для лечения различных патологий, таких как эпилепсия, гепатит, флебофлогоз, заболевания почек и кожные инфекции, а также в качестве мочегонных и анальгетических средств [2]. Предыдущие фитохимические исследования различных видов подмаренника показали наличие иридоидов, терпеноидов, антрахинонов и флавоноидов [3–5]. Высокое содержание фенольных соединений свидетельствует о перспективности изучения экстрактов этих растений на предмет антиоксидантной активности.

В ходе нормального клеточного метаболизма постоянно образуются активные формы кислорода (АФК), которые играют важную роль в защите организма, а также выступают в качестве регуляторных медиаторов. Однако их избыток приводит к окислительному стрессу, который определяется как дисбаланс между продукцией и утилизацией АФК. Из-за своей способности повреждать многие клеточные структуры, включая липиды, белки и ДНК, АФК участвуют в процессах старения и приводят к заболеваниям [6]. Антиоксиданты могут предотвращать окислительное повреждение, подавляя образование реактивных частиц, ингибируя свободнорадикальные процессы или повышая уровень эндогенной антиоксидантной защиты. В связи с этим и по сей день не теряют актуальности исследования, направ-

ленные на поиск продуктов питания и растительного сырья, богатого природными антиоксидантами.

Целью работы является изучение антиоксидантной активности экстрактов из растений рода Подмаренник, распространенных на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы. Растительное сырье, использованное в эксперименте (подмаренника настоящего, п. мягкого, п. душистого и п. цепкого трава), было заготовлено в период цветения в июне 2020 г. в окрестностях д. Дукора, Пуховичского района, Минской области Республики Беларусь. Сырье заготавливалось в сухую солнечную погоду, использовалась воздушно-тенева сушка.

Экстрагирование проводили в аппарате Сокслета с использованием измельченного (710) сырья и 70% этанола в течение 24 часов. Полученный экстракт фильтровали, упаривали растворитель в вакууме (40-50° С) на роторном испарителе и высушивали в вакуумном эксикаторе до содержания влаги не более 5%. Готовый продукт хранили в герметично закрытой таре в холодильнике при температуре не выше 4° С.

Для определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах использовали спектрофотометрический метод, основанный на восстановлении фосфорномолибденово-вольфрамового реактива (реактива Фолина-Чокальтеу) в щелочной среде с образованием окрашенных продуктов [7]. Калибровку проводили с использованием стандартных растворов галловой кислоты (20–1000 мкг/мл). Общее содержание фенольных соединений выражалась в эквивалентном содержании галловой кислоты (мг) в единице массы сухого экстракта (г).

Содержание флавоноидов в полученных экстрактах определяли спектрофотометрическим методом с использованием реакции комплексообразования с Al(III) [8]. Калибровочный график строили с использованием стандартных растворов рутина (50–1000 мкг/мл). Содержание флавоноидов (мг/г) в сухом экстракте выражали в пересчете на рутин.

Радикал-нигибирующую активность изучали спектрофотометрически с использованием спиртового раствора ДФПГ (дифенилпикрилгидразил) по методике, описанной в [9]. Степень ингибирования экстракта определяли по формуле:

$$I = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_n} \times 100\%, \quad (1)$$

где I – степень ингибирования, %;

A_0 – оптическая плотность контрольного опыта (без добавления экстракта);

A_1 – оптическая плотность основного опыта (с добавлением экстракта);

A_2 – оптическая плотность раствора сравнения.

На основании данных о степени ингибирования при различных концентрациях экстрактов рассчитывали концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50} , мкг/мл).

Ингибирующую активность экстрактов в отношении оксида азота (II) (IC_{50} , мкг/мл) вычисляли путем спектрофотометрического определения концентрации NO, сгенерированного натрия нитропруссидом [10]. Степень ингибирования экстракта определяли по формуле (1).

Ингибирующую активность в отношении пероксида водорода (IC_{50} , мкг/мл) определяли по методике [11]. Степень ингибирования экстракта определяли по формуле (1).

Метод определения ингибирования супероксид анион-радикала основан на количественном определении супероксида по образующемуся в реакции с солями тетразолия формазану. Генерирование супероксид анион-радикала проводили в растворе щелочного ДМСО [12]. Степень ингибирования экстракта определяли по формуле (1). Ингибирующий эффект экстрактов в отношении восстановления неотетразолия хлорида супероксид анион-радикалом выражали в величинах концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50} , мкг/мл), найденной путем интерполяции.

Обсуждение результатов. Общее содержание фенольных соединений и флавоноидов в сухих экстрактах растений рода Подмаренник представлено в табл. 1. Полученные данные согласуются с литературными данными [3, 5]. Следует отметить, что наибольшим содержанием фенольных соединений характеризуется экстракт травы подмаренника настоящего и подмаренника мягкого.

Для определения перспективного сырья получения биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами была изучена радикал-ингибирующая активность экстрактов *in vitro* в отношенииДФПГ-радикала, а также основных звеньев оксидативного стресса: пероксида водорода, супероксид анион-радикала, оксида азота (II).

В табл. 1 представлены величины концентраций полумаксимального ингибирования сухих экстрактов (IC_{50} , мкг/мл) в отношении перечисленных радикалов.

Таблица 1. Общее содержание фенольных соединений и флавоноидов в сухих экстрактах растений рода *Galium* и их радикал-ингибирующая активность

	Производящее растение			
	<i>Galium verum</i>	<i>Galium odoratum</i>	<i>Galium mollugo</i>	<i>Galium aparine</i>
Общее содержание фенольных соединений, мг экв. галловой кислоты/г	119,6±0,7	50,7±1,5	119,5±2,3	33,2±1,5
Содержание флавоноидов, мг экв. рутина/г	133,9±0,9	79,3±2	127,6±2,8	64,4±1,4
IC ₅₀ (ДФПГ), мкг/мл	12,1±0,3	25,2±0,8	13,0±0,3	20,5±0,4
IC ₅₀ (NO), мкг/мл	222,3±18,0	375,3±6,9	199,4±5,4	280,0±18,0
IC ₅₀ (H ₂ O ₂), мкг/мл	1970±71	2123±66	1860±88	2186±61
IC ₅₀ (O ₂ ^{-·}), мкг/мл	270,0±19,6	390,0±19,8	290,0±8,5	403,5±36,6

Все исследованные экстракты характеризуются умеренной или высокой радикал-ингибирующей активностью. Однако наиболее высокую активность продемонстрировали экстракты травы подмаренника настоящего и подмаренника мягкого. Отметим, что величины IC₅₀ во всех выбранных тест-системах коррелируют с общим содержанием фенолов и флавоноидов. Согласно [3] в траве подмаренника настоящего отмечено высокое содержание флавонольных гликозидов: астрагалина (кемпферол-3-*O*-β-глюкопиранозида) и рутина (кверцетин-3-*O*-рутинозида), а авторами работы [5] в траве подмаренника мягкого было установлено присутствие мирицетин-3-*O*-рамнозида, кверцетин-3-*O*-глюкозида, лютеолин-7-*O*-глюкозида, кверцетин-3-*O*-малонилглюкозида, кверцетин-3-*O*-рамнозида и апигенин-7-*O*-глюкозида.

На основании полученных результатов с учетом данных литературы можно предположить, что значительную роль в реализации антиоксидантной активности экстрактов растений рода Подмаренник играют содержащиеся в них фенольные соединения, прежде всего, флавоноиды.

Выводы. Таким образом, принимая во внимание высокое содержание фенолов (119,5–119,6 мг галловой кислоты/г, в том числе флавоноидов – 127,6–133,9 мг рутина /г) в исследованных экстрактах, а также их способность ингибировать свободно-радикальные процессы с участиемДФПГ-радикала, NO, O₂⁻, H₂O₂ (IC₅₀ 12,1–13,0; 199,4–222,3; 270,0–290,0; 1860–1970 мкг/мл соответственно), среди распространенных на территории Республики Беларусь растений рода *Galium* наиболее перспективными сырьевыми источниками природных антиоксидантов можно считать *Gallium verum* и *Gallium mollugo*. Данные растения относятся к малоизученным и находят пока применение лишь в народной медицине, в связи с чем они представляют интерес для более детального фитохимического и фармакологического изучения.

Список литературы

1. Ehrendorfer F. *Galium L.* / F. Ehrendorfer, F. Krendl, C. Puff / In: *Flora Europaea* / T. Tutin (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 1976, – P. 14-36.
2. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia) / S. Jarić [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. –Vol. 111(2), 2007. P. 341-364.
3. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum* / L.Ö. Demirezer [et al.] // *Turkish Journal of Chemistry*. 2006. Vol. 30. P.525- 530.
4. Iridoids from *Galium mollugo* / S. Uesato [et al.] // *Phytochemistry*. 1984. Vol. 23. P. 2535-2537.
5. Unusual compounds from *Galium mollugo* and their inhibitory activities against ROS generation in human fibroblasts / N. Chaher [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016. Vol. 32. P.420-430
6. Halliwell B. The definition and measurement of antioxidants in biological systems / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. 1995. Vol. 18. P.125-126.
7. Singleton V.L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós // *Methods in Enzymology*. 1999. Vol. 299. P. 152-178
8. Zhishen J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals / J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming // *Food Chemistry*. 1999. Vol. 64 (4). P. 555-559

9. Kedare S.B. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay / S.B. Kedare, R.P. Singh. // J. Food Sci. Technol. 2011. Vol. 48(4). P. 412–442.

10. Patel A. Determination of polyphenols and free radical scavenging activity of Tephrosia purpurea linn leaves (Leguminosae) / A. Patel, A. Patel, N.M. Patel // Pharmacognosy Research. Vol. 2(3). P. 152-158.

11. Kumar R.S. Antioxidant activities of Indigofera cassioides Rottl. Ex. DC. using various in vitro assay models / R.S. Kumar, B. Raj Kapoor, P. Perumal // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012. Vol. 2(4). P. 256–261.

12. Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generating system / K. Hyland [et al.] // Analytical Biochemistry. 1983. Vol. 135(2). P. 280-287.

УДК 577.334; 544.722

*Горобец М.Г.¹, Абдуллина М.И.¹, Бычкова А.В.¹,
Дегтярев Е.Н.^{1,2}, Мотякин М.В.^{1,2}, Коварский А.Л.¹*

*ФГБУ Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН¹*

Россия, Москва

*ФГБУ Федеральный исследовательский
центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН²*

Россия, Москва

maria.g.gorobets@gmail.com, triyozhika@gmail.com,

anna.v.bychkova@gmail.com,

degen@chph.ras.ru, motyakin@hotmail.com,

alkogon383@yandex.ru

Оценка генерации АФК под действием магнитных наночастиц и пероксида водорода

С использованием субстратов о-фенилендиамина (оФДА), 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) продемонстрирована генерация активных форм кислорода (АФК) в золях магнитных наночастиц (МНЧ), пероксидазы хрена (HRP) и Fe(II) в присутствии пероксида водорода. Показана зависимость количества продуктов окисления от концентрации МНЧ в золе, обусловленная присутствием Fe(II) на поверхности частиц. Также показано влияние белка на генерацию АФК на поверхности МНЧ и в растворах HRP.

Ключевые слова: *активные форма кислорода, магнитные наночастицы, окисление, о- фенилендиамин (оФДА), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ).*

*Maria Gorobets¹, Madina Abdullina¹, Anna Bychkova¹,
Yevgeniy Degtyarev^{1,2}, Mikhail Motyakin^{1,2}, Alexander Kovarski¹
N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of
Sciences¹,
Russia, Moscow
N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian
Academy of Sciences², Russia, Moscow*

Estimation of ROS generation under the action of magnetic nanoparticles and hydrogen peroxide

We demonstrated the ROS generation in sols of magnetic nanoparticles (MNPs), solutions of horseradish peroxidase and Fe(II) in presence of hydrogen peroxide using oPDA and TMB. The quantity of the oxidized products is shown to depend on the concentration of MNPs in sol. This effect is caused by presence of Fe(II) on the surface of MNPs. Decreased ROS generation on the MNPs surface in the presence of protein is also shown.

Key words: *reactive oxygen species, magnetic nanoparticles, free radical oxidation, ortho-phenyldiamine (oPDA), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB).*

Наночастицы оксидов железа в течение последних десятилетий используются при создании функциональных материалов биомедицинского назначения – например, медицинских имплантов, а также материалов для адресной доставки лекарственных веществ, магнитной гипертермии, магнитной сепарации, магнитно-резонансной томографии. Наночастицы оксидов железа при физиологических условиях обладают активностью пероксидазы и каталазы, содержащих в своем составе гем (комплексное соединение с железом), такие частицы получили название IONzymes. IONzymes вызывают генерацию радикалов в присутствии H_2O_2 и замедляют рост опухолей. Апоптоз (ферроптоз) опухолей под действием IONzymes впервые продемонстрирован в 2016 году [1].

Для идентификации короткоживущих радикалов в химии и биологии широко используются спиновые ловушки [2]. При их реакции с короткоживущими радикалами образуются спиновые аддукты – стабильные нитроксильные радикалы, по магнитно-резонансным параметрам (константа СТВ, g-фактор) которых определяется структура присоединенного радикала. В последние годы метод спиновых ловушек стал широко применяться для подтверждения пероксидазной и каталазной активности поверхности наночастиц оксидов железа [1, 3].

В настоящей работе продемонстрирована генерация АФК под действием МНЧ в растворах пероксида водорода, определены кинетические и концентрационные закономерности генерации АФК. Для подтверждения генерации магнитными наночастицами свободных радикалов и выявления их природы использовали спиновые ловушки PBN (N-tert-Butyl- α -phenylnitron) и DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide). Для оценки генерации АФК использовались о-фенилендиамин (оФДА), продукт окислительной модификации которого имеет максимум поглощения при 418–455 нм, и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), образующий при взаимодействии с АФК продукт с максимумом поглощения при 370, 450 и 650 нм.

На рисунках 1А и 1Б представлены экспериментальные спектры (спектры 1) спинового аддукта, полученного при добавлении PBN и DMPO соответственно в водный раствор пероксида водорода с магнитными наночастицами. Моделирование спектров спиновых аддуктов PBN позволило получить следующие константы СТВ: $a_N=15.46$ Гс, $a_H=2.70$ Гс, которые хорошо совпадают с известными в литературе значениями констант для спинового аддукта, образующегося в реакции ловушки PBN с $\cdot\text{OH}$ (гидроксильный) радикалом (или PBN/ $\cdot\text{OH}$) [4]. Для спиновых аддуктов DMPO были получены константы СТВ $a_N=14.9$ Гс и $a_H=15.0$ Гс, характерные для нитроксильного радикала, также, с захваченным $\cdot\text{OH}$ -радикалом [1, 5]. Отметим отсутствие генерации детектируемых стабильных радикалов в отсутствие МНЧ, а также отсутствие генерации значимого количества свободных радикалов, перехватываемых ловушкой, в случае отсутствия пероксида водорода в реакционной системе. Таким образом, результаты, полученные нами с применением спиновых ловушек, однозначно свидетельствуют о генерации поверхностью МНЧ гидроксильных радикалов в присутствии пероксида водорода:

С использованием оФДА (рис. 2) и ТМБ (рис. 3) показана генерация радикалов в системах, содержащих МНЧ и HRP, также при помощи оФДА продемонстрирована генерация радикалов железом (II) в присутствии пероксида водорода (рис. 2).

Количество продуктов окисления субстратов зависит от концентрации МНЧ в растворе в диапазоне концентраций МНЧ 0,0025 – 0,036 мг/мл (для оФДА) и 0,0025 – 0,1 мг/мл (для ТМБ) (рис. 4). Показано, что данный эффект обусловлен присутствием железа (II) на поверхности МНЧ (в отсутствие железа (II) на поверхности МНЧ продукт окисления оФДА не генерируется). Для ТМБ отмечено, что системы, содержащие стоп-реагент (1н H_2SO_4), демонстрируют более значительный рост по сравнению с системами, в которые стоп-реагент не был добавлен.

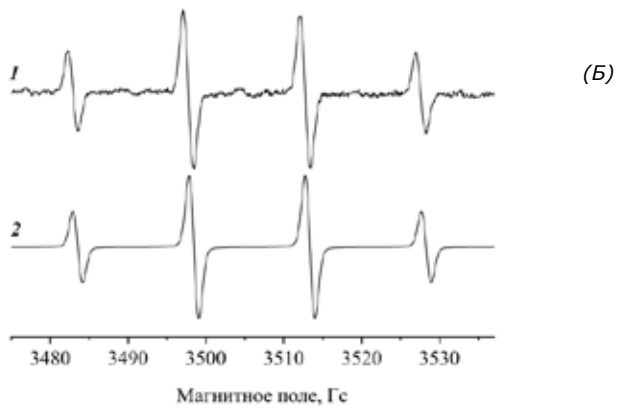
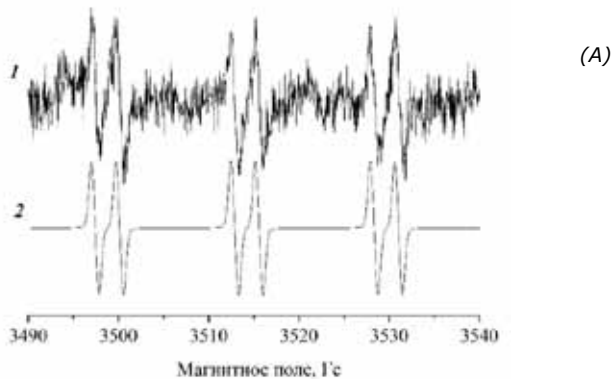
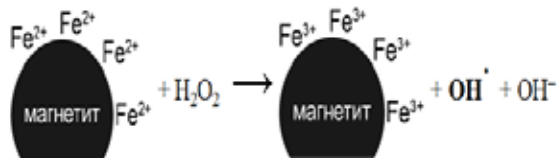


Рис. 1. Экспериментальные (1) и симулированные (2) ЭПР спектры спинового аддукта РВН (А) и спинового аддукта ДМРО (Б) в водном растворе, содержащем МНЧ и пероксид водорода. Симулированные спектры спиновых аддуктов получены при использовании магнитно-резонансных параметров, указанных в тексте

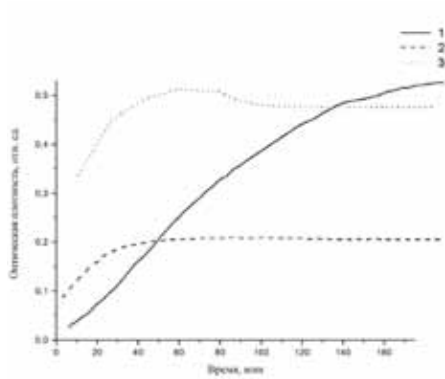


Рис. 2. Кинетика генерации продукта окисления ($\lambda_{\max}=418$ нм) 0,07 мМ оФДА под действием: 1 – МНЧ 0,037 мг/мл + 9,8 мМ H_2O_2 (базовая линия от МНЧ), 2 – $3,6 \cdot 10^{-8}$ мМ HRP + 0,036 мМ H_2O_2 ; 3 – 0,07 мМ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ + 0,84 мМ H_2O_2 .

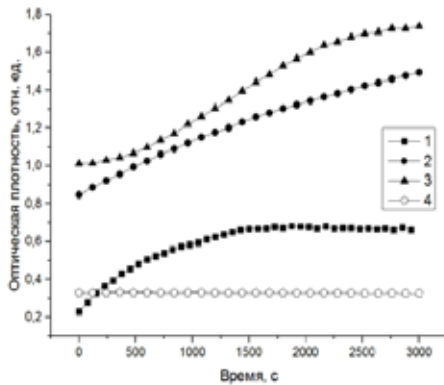
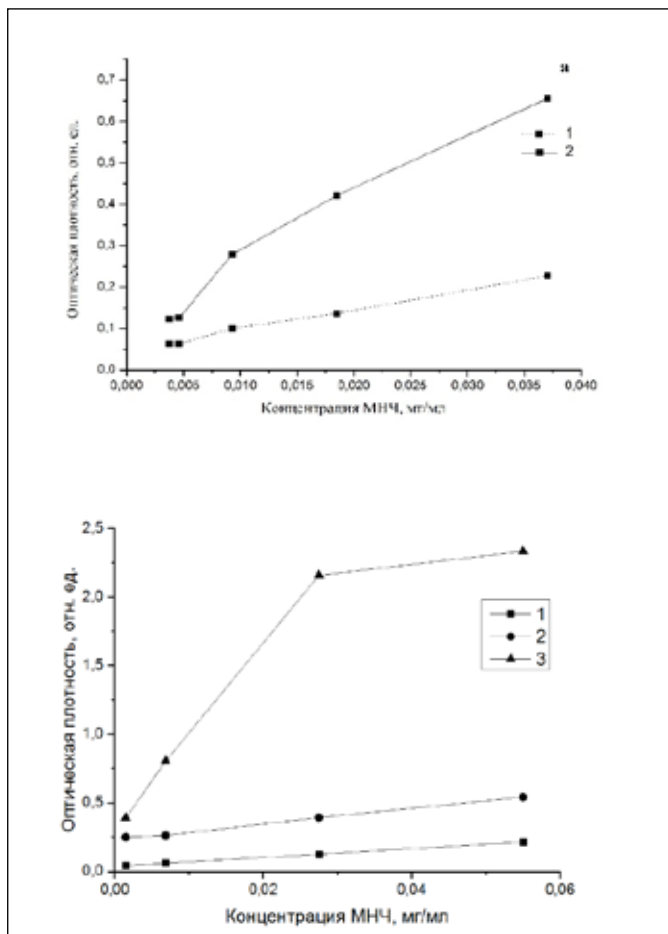


Рис. 3. Кинетика генерации продукта окисления ТМБ в системах: 1 – $1,13 \cdot 10^{-10}$ М HRP + $0,28 \cdot 10^{-4}$ мМ ТМБ + 2,66 мМ H_2O_2 , 2 – МНЧ 0,1 мг/мл + 0,07 мМ ТМБ + 8,77 мМ H_2O_2 + стоп-реагент (1н H_2SO_4), 3 – МНЧ 0,1 мг/мл + 0,26 мМ ТМБ + 1,33 мМ H_2O_2 + стоп-реагент (1н H_2SO_4), 4 – МНЧ 0,1 мг/мл



а

б

Рис. 4. Зависимость оптической плотности ($\lambda_{\max}=418$ нм для оФДА, $\lambda_{\max}=450$ нм для ТМБ) от концентрации МНЧ в системах: (а) МНЧ (1); 0,07 мМ оФДА + 9,8 мМ H_2O_2 + МНЧ (2); (б) МНЧ (1); 0,25 мМ ТМБ + МНЧ + 53,8 мМ H_2O_2 до (2) и после (3) добавления стоп-реагента (1н H_2SO_4)

Также исследовано влияние белка на генерацию продукта окисления оФДА под действием МНЧ и НРР в присутствии H_2O_2 . В присутствии человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) отмечено снижение детектируемого продукта окисления оФДА, если генерация АФК происходит под действием МНЧ, и отсутствие изменений в детектирова-

нии продукта окисления оФДА, если генерация АФК проводится под действием HRP (при концентрации HRP $3,6 \cdot 10^{-11}$ М). Данный эффект может быть обусловлен снижением процесса генерации радикалов на поверхности МНЧ вследствие адсорбции белка на поверхности МНЧ.

Исследование выполнено при частичной поддержке гранта Президента РФ МК-3601.2019.3.

Список литературы

1. Voinov M. A., Pagan J.O.S, Morrison E., Smirnova T.I., Smirnov A.I. Surface-Mediated Production of Hydroxyl Radicals as a Mechanism of Iron Oxide Nanoparticle Biototoxicity // J. Am. Chem. Soc. 2015. V. 133 N. 1. P. 35– 41.
2. Villamena F.A. Reactive Species Detection in Biology: From Fluorescence to Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy // Amsterdam: Elsevier. 1st edition. 2015. 340 P.
3. Nosaka Y., Nosaka A.Y. Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis // Chem. Rev. 2017. V. 117. P. 11302–11336.
4. Janzen E., Kotake Y., Randall H. Stabilities of hydroxyl radical spin adducts of PBN-type spin traps // Free Radic. Biol. Med. 1992. V. 12. P. 169–173.
5. Buettner G.R. Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528V // Free Radic. Biol. Med. 1987. V. 3. P. 259–303.

УДК 547.915, 604

*Дадали В.А.¹, Соколова Е.А.², Степанова Н.П.³,
Власова Е.А., Сенатуллова М.Д.*

*ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И. Мечникова Минздрава России¹
vdadali@mail.ru¹, Elena.Sokolova@szgmu.ru²,
Natalya.Stepanova@szgmu.ru³*

Количественное определение каротиноидов в растительных маслах

В работе использован спектральный экспресс-метод определения суммарного содержания каротиноидов, предложенный для исследования проб, полученных из семян масличных растений [1] и модифицированный для анализа растительных масел. Определено суммарное содержание каротиноидов в 13 маслах. Показана эффективность метода и хорошая воспроизводимость результатов.

Ключевые слова: *природные соединения, каротиноиды, спектральные методы определения, растительные масла.*

*Dadali V.A.¹, Sokolova E.A.², Stepanova N.P.³
North-Western State Medical University named
after I.I. Mechnikov
Saint-Petersburg*

Quantitative determination of carotenoids in plant oils

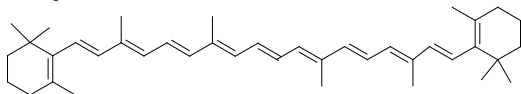
The paper describes a spectral express method for determination the total content of carotenoids, proposed for research of samples obtained from seeds of oil-bearing plants [1] and modified for the analysis of plant oils. The total content of carotenoids in 13 oils was determined. The efficiency of the method and good reproducibility of the results are shown.

Key words: *natural compounds, carotenoids, spectral detection methods, plant oils.*

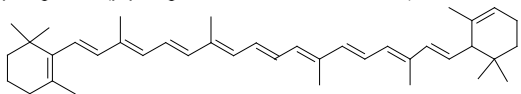
Актуальность. Каротиноиды – природные изопреноиды, обладающие широким спектром биологического действия [2,3], применяются в пищевой промышленности как натуральные пигменты и антиоксиданты (Е160а и др.), используются в медицине и животноводстве. В настоящее время насчитывается более 700 представителей этого класса [2,3]. Они синтезируются высшими растениями, водорослями, лишайниками, грибами и микроорганизмами. В природе эти вещества встречаются как в свободном состоянии, так и в связанном – в виде сложных эфиров и гликозидов, а также в составе каротинопротеинов. По мере совершенствования техники исследования число изученных соединений этого класса ежегодно возрастает [4]. Некоторые из них, такие как β-каротин и образующийся из него ретинол, β-апо-8-каротиналь и др., могут быть получены синтетически и использованы наряду с природными экстрактами для повышения качества пищевых масел. В этих условиях **актуальной задачей** является модификация и расширение возможностей применения спектрального метода анализа каротиноидов в пищевых, парфюмерных и фармакопейных маслах.

Введение. Каротиноиды классифицируются по структуре на углеводороды каротины (α-, β-, γ- и др.) и их кислородсодержащие производные – ксантофилы (β-криптоксантин (3R) и его энантиомер (3S); изомерные по положению двойной связи и конфигурации гидроксильной группы лютеин и зеаксантин; виолаксантин, неоксантин, фукоксантин и др.) Для структуры каротиноидов характерно наличие сопряженной системы двойных связей (рис. 1).

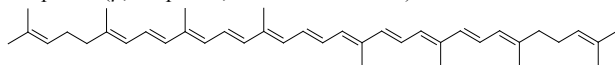
А. Каротины



β -каротин (β, β -каротин, CAS RN 7235-40-7)

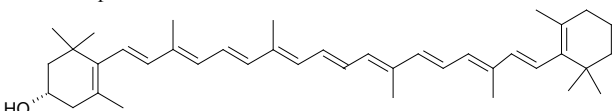


α -каротин (β, ϵ -каротин, CAS RN 7488-99-5)

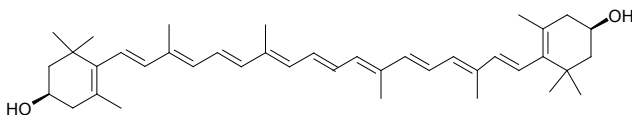


ликопин (ψ, ψ -каротин, CAS RN 502-65-8)

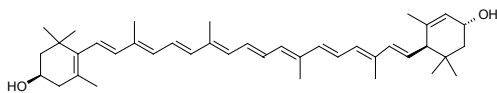
Б. Ксантофиллы



β -криптоксантин ((3R)- β, β -каротин-3-ол, CAS RN 472-70-8)



зеаксантин (β, β -каротин-3,3'-диол CASRN144-68-3)



лютеин, или ксантофил (β, ϵ -каротин-3,3'-диол, CASRN 127-40-2)

Рис. 1. Структура некоторых каротиноидов [2,3,5]

В видимой области спектра поглощают свет каротиноиды, содержащие не менее 7 сопряженных двойных связей в цепи [6]. Так, фитофлуин (7,7',8,8',11,12-гексагидро- ψ, ψ -каротин), содержащий только 5 сопряженных двойных связей – поглощает свет в УФ диапазоне ($\lambda_{\max} = 367, 348, 332$ нм), бесцветен, а ζ -каротин (7,7',8,8'-тетрагидро- ψ, ψ -каротин) с 7 сопряженными двойными связями имеет полосы поглощения в видимой области спектра в диапазоне 400-550 нм и окрашен в желтый цвет [6]. Наличие сопряженной системы двойных связей в молекуле,

с одной стороны, позволяет использовать спектроскопию в видимой области для определения концентрации, но с другой стороны, делает эти вещества фото- и термолабильными, чувствительными к воздействию кислорода воздуха, кислот и щелочей, что затрудняет их количественное определение, особенно при продолжительном исследовании и повышает значимость использования экспресс-методов анализа.

Целью работы является оценка возможности применения спектрального экспресс-метода для определения общего содержания каротиноидов в растительных маслах.

Материалы и методы. Каротиноиды являются неполярными соединениями и экстрагируются из природного сырья органическими растворителями, такими как гексан, петролейный эфир, хлороформ, сероуглерод, ацетон и др. [8]. Описаны методы экстракции каротиноидов из пальмового, рапсового, соевого, подсолнечного и др. растительных масел с последующим хроматографическим определением компонентов экстракта. При этом увеличение полярности растворителя закономерно приводит к повышению доли ксантофиллов в экстракте [7] и снижает точность определения суммы каротиноидов в единицах β -каротина, поэтому в данной работе в качестве растворителя был использован гексан (ч.д.а.). На всех этапах пробоподготовки и определения следует избегать воздействия на пробу прямого света и повышенных температур [8].

Описанный в работе [1] спектральный метод определения суммарного содержания каротиноидов в единицах β -каротина, был нами модифицирован и применен для исследования 13 растительных масел: 9 пищевых, 3 парфюмерно-косметических и 1 фармакопейного (см. табл. 1).

К 0,2-1,0 мл масла добавляли гексан до объема пробы 5 мл и измеряли оптическую плотность (D) полученного раствора при длине волны поглощения β -каротина $\lambda_{\text{max}}=450$ нм. Концентрацию (моль/л) и общую массу (мг) каротиноидов в масле рассчитывали по уравнению, используя коэффициент молярной экстинкции для транс- β -каротина в гексане

$$\varepsilon=139049 \text{ л}/(\text{моль} \times \text{см}): C=D/\varepsilon \times l, m=MW \times C \times V, \\ MW - \text{молярная масса } \beta\text{-каротина (536,86 г/моль)}.$$

При необходимости пробу разбавляли и при расчете учитывали коэффициент разбавления. Содержание каротиноидов рассчитывали в мг/100 мл масла.

Приборы и оборудование. Спектрофотометры СФ-46, PV 1251С «SOLAR»; диапазон длин волн $\lambda=380\text{-}500$ нм; кювета $l=1$ см.

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты приведены в табл. 1. Для расчетов использовали значение доверительной вероятности $\alpha=0,9$; $n=3$; $t_{\text{ан}}=2,92$.

Таблица 1. Содержание каротиноидов в растительных маслах, определенное прямым спектральным экспресс-методом

№ п/п	Образец растительного масла	Содержание каротиноидов, мг/100 мл	Характеристика масла
Масла пищевые			
1.	Масло подсолнечное «Золотая семечка», рафинированное, дезодорированное, замороженное)	0,06±0,01	Содержит глицериды олеиновой и линолевой кислот; фосфолипиды и фитостерины. Нерафинированное масло обогащено также витаминами Е, К, В ₁ , В ₂ , РР
2.	Масло подсолнечное «Дары Кубани» нерафинированное	0,18±0,02	
3.	Масло льняное нерафинированное	0,86±0,03	Характеризуется высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот – линолевой (ω -6) и α -линоленовой (ω -3), содержит также γ -линоленовую кислоту (ω -6), фитостерины, каротиноиды, флавоноиды, витамины: А, Е, В ₁ , В ₂ , В ₃ , биотин, фолиевую и пантотеновую кислоты, минеральные вещества: К, Р, Mg.
4.	Масло льняное пищевое, нерафинированное с растительным экстрактом моркови «Морковное масло»	1,37±0,03	
5.	«Масло рыжиковое» из семян масличной культуры <i>Camelina sativa</i> нерафинированное	0,95±0,03	Вырабатывается из семян масличного растения рыжика (семейство Brassicaceae). Является источником (ω -3) α -линоленовой кислоты. Содержит фитостерины, каротиноиды, витамины А, Е, минеральные вещества К и Mg. Рекомендуется как средство профилактики при гипертонии, ишемии, стенокардии; анемии, атеросклерозе и варикозе.
6.	Оливковое масло «Extra Virgin Olive Oil» нерафинированное высшего качества 1-го прессования (отжима)	0,42±0,03	Отличается высоким содержанием олеиновой кислоты, фитостеринов, тритерпеноидов, витаминов В ₁ , В ₃ , В ₆ ; флавоноидов апигенина и глюколютеолина; гликозида эскулина; полифенола олеуропеина

№ п/п	Образец растительного масла	Содержание каротиноидов, мг/100 мл	Характеристика масла
7.	Масло кукурузное «Благо» рафинированное	0,82±0,07	Содержит глицериды жирных кислот: пальмитиновой и стеариновой, олеиновой, линолевой; фосфолипиды; фитостерины, витамины В ₁ , В ₂ , В ₆ , РР, Р, Е, зеаксантин, пантотеновую кислоту, биотин, флавоноиды: изокверцетин, кверцетин, лютеолин, мирисцетин, эпикатехин
8.	Масло конопляное нерафинированное холодного отжима, 100%. ООО ПК «Вкусы здоровья»	1,69±0,01	Наряду с каротиноидами, содержит необходимые ω ₃ -жирные кислоты.
9	«Виноградное масло» – масло рафинированное виноградной косточки. ООО ПК «Вкусы здоровья»	0,18±0,02	Содержит линолевую кислоту, флавоноиды – проантоцианидины (изокверцитрин и кемпферол) алкалоид магнофлорин витамины В ₁ , В ₂ , РР и др.
Масла парфюмерные			
10.	Масло виноградной косточки, 100% натуральное, парфюмерное (масло из семян винограда)	0,13±0,03	Парфюмерное масло используется наружно (в косметологии и ароматерапии) при недостаточности вен и лимфатических сосудов, для профилактики преждевременного старения.
11.	Лимонное масло (парфюмерно-косметический продукт)	0,14±0,01	Лимонное и апельсиновое парфюмерные масла используются в косметологии и ароматерапии
12.	Масло красного апельсина (парфюмерно-косметический продукт)	2,31±0,03	
Масло фармакопейное			
13.	«Облепиховое масло» – масло плодов облепихи крушиновидной (для приема внутрь и наружного применения). ЗАО «Алтайвитамины»	276±0,09	Содержит нутриенты: полиненасыщенные жирные кислоты, каротиноиды, кумарины, пектины, фитонциды, фитостеролы, флавоноиды, витамины А, С, Е, К, Р, В, минеральные вещества Al, B, Co, Ni, S, Fe, Ca, P, Mo, Mg, Na

На содержание каротиноидов в природных растительных маслах влияют различные факторы: место и условия выращивания растений, время сбора сырья, технологические условия его хранения и переработки, а также методы и условия определения. В результате содержание каротиноидов в пищевых, парфюмерных и даже фармакопейных маслах варьирует. При небольшом содержании каротиноидов приведенные в литературе данные различаются. Так, по разным источникам [9,10] в нерафинированном подсолнечном масле содержится каротиноидов от 0,026 мг до 0,100 мг/100 г масла, в том же рафинированном масле – 0,05 мг/100 г масла.

Из 9 исследованных нами образцов пищевых масел наименьшее содержание каротиноидов ($0,06 \pm 0,01$ мг/100 мл) установлено в рафинированном подсолнечном масле, в три раза меньше, чем в нерафинированном. Наиболее богатыми каротиноидами оказались пищевые масла: «Морковное масло», содержащее экстракт моркови ($1,37 \pm 0,13$ мг/100 мл), «Рыжиковое масло» ($0,95 \pm 0,03$ мг/100 мл) и льняное нерафинированное масло ($0,86 \pm 0,03$ мг/100 мл). Из полученных данных видно, что нерафинированное льняное и рыжиковое масла, которые обычно рассматривают как источник дефицитных в питании ω -3 полиненасыщенных жирных кислот, являются также источником каротиноидов, содержание которых приближается к таковому в «Морковном масле».

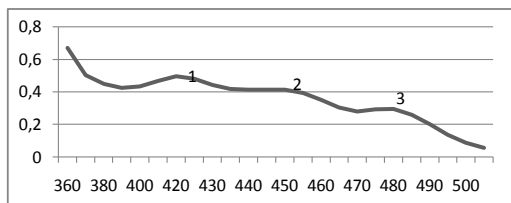


Рис. 2. Спектр поглощения образца «Масло рыжиковое»

Следует отметить, что спектр поглощения рыжикового масла в видимой области (рис. 2) отличается от спектров других пищевых масел. Наибольшее поглощение наблюдается при длине волны не 450, а 410 нм, что соответствует поглощению низкомолекулярных (напр., кросетина) и окислированных (напр., хризантемоксантина) каротиноидов. Возможно, это связано с технологией производства, в процессе которого происходит образование побочных продуктов, уменьшающее точность определения в единицах β -каротина.

Определение компонентов пищевых продуктов, в том числе, и растительных масел регламентируется ГОСТом [11]. Однако в исследо-

ваниях часто используются неунифицированные методы хроматографии (ВЖХ, ТСХ и др.), хроматомасс-спектрологии и спектрологии поглощения в видимой области [12]. Перечисленные методы требуют значительных затрат времени и реактивов, в том числе стандартных образцов, в отличие от используемого в работе метода.

Состав фармакопейных масел всегда стандартизирован. Определенное в работе содержание каротиноидов в облепиховом масле ($276 \pm 0,09$ мг/100 мл) хорошо согласуется с заявленными для препарата данными (не менее 1,8 мг/мл или 180–208 мг/100 г масла).

Выводы. Использованный в работе спектральный экспресс-метод позволяет получить воспроизводимые результаты даже при незначительном содержании каротиноидов в образцах, коррелирующие со средними литературными данными. Метод можно рекомендовать для быстрого и эффективного определения суммарного содержания каротиноидов в растительных маслах.

Список литературы

1. Gornas P., Rudzinska M., Raczek M., Misina I., Soliven A., Seglina D. Chemical Composition of Seed Oils Recovered from Different Pear (*Pyrus communis* L.) Cultivars. // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2016. 93. 267-274.
2. Дадали В.А., Тутельян В.А., Дадали Ю.В., Кравченко Л.В. Каротиноиды. Биодоступность, биотрансформация, антиоксидантные свойства // *Вопросы питания.* 2010. Т.79. №2. С. 4-18.
3. Дадали В.А., Тутельян В.А., Дадали Ю.В., Кравченко Л.В. Каротиноиды. Биологическая активность. // *Вопросы питания.* 2011. Т. 80. №4. С. 4-18.
4. Gomez-Garcia M.R., Ochoa-Alejo N. Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum* spp.). *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, No14, pp. 19025-19053.
5. Chemical Abstract Index Gide. American Chemical Society. 1999.
6. Курегян А.Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов // *Фундаментальные исследования.* 2015. № 2-23. С. 5166-5172.
7. Ладыгин В.Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей / *Вопросы современной альгологии.* Пушкино, 2015. 87 с.
8. Butnariu M. Methods of analysis (extraction, identification and quantification) of carotenoids from natural products. // *J. Ecosys. Ecograph.* 2016. V.6 (2). С.193.
9. Увлекательно о фармакогнозии. URL: <http://pharmacognosy.com.ua/> (дата обращения: 15.09.2020).
10. Способ извлечения каротина из каротиносодержащих материалов.

URL: <https://findpatent.ru/patent/222/2224012.html> (дата обращения: 15.09.2020).

11. ГОСТ 3 54058-2010 Продукты пищевые функциональные. Метод определения каротиноидов. Дата введения 2012-01-01. ОКС 67.220.20. ОКСТУ 9109.

12. Чечета О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента // Сорбционные и хроматографические процессы.- 2008.- Т.8.- Вып. 2. С. 320-326.

УДК 541.49.183:546.562.723:547.854.5

Дмитриева И.Б., Чухно А.С., Соловьева М.А.¹, Сухоруков А.А.²
ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет (СПХФУ)

Россия, Санкт-Петербург
soloveva.margarita@pharminnotech.com¹,
suhorukov.anton@pharminnotech.com²

Влияние препаратов инсулина на физико-химические свойства компонентов крови

Препараты инсулина включены в перечень ЖНВЛП, поэтому необходим постоянный мониторинг их качества, эффективности и безопасности для пациентов. Цель данного исследования – рассмотреть влияние препарата инсулина на физико-химические свойства основных компонентов крови – альбумина и гемоглобина, для выявления возможных побочных эффектов в месте введения препарата.

Ключевые слова: *альбумин, вязкость, гемоглобин, инсулин, поверхностное натяжение, электрокинетический потенциал.*

Dmitriyeva I.B., Chukhno A.S., Soloveva M.A.¹, Sukhorukov A.A.²
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
Russia, St. Petersburg
soloveva.margarita@pharminnotech.com¹,
suhorukov.anton@pharminnotech.com²

Effect of insulin medications on the physicochemical properties of blood components

Insulin medications are included in the VED list, therefore, constant monitoring of their quality, efficiency and safety for patients is required. The

purpose of this study is to examine the effect of the insulin medication on the physicochemical properties of the main blood components – albumin and hemoglobin, in order to identify possible side effects at the injection site.

Key words: *albumin, viscosity, hemoglobin, insulin, surface tension, electric surface potential.*

Инсулин является гормоном белково-пептидной природы, вырабатываемый клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Общая молекулярная масса молекулы – 5808 Da [1]. Вследствие обратимых реакций молекулы инсулина способны образовывать агрегаты с большей молекулярной массой, различной при неодинаковых условиях и методах определения. На образование тех или иных агрегатов, а соответственно и на величину молекулярной массы влияют рН, ионная сила и концентрация раствора. Эти различия подтверждаются определением данного параметра методами седиментации и диффузии, осмотического давления. В кристаллическом виде, т.е. в комплексе с ионами цинка, инсулин обладает молекулярной массой около 6 kDa. При обычных условиях гормон наиболее устойчив в виде димера (Mг=12 kDa). Растворы кристаллического инсулина гомогенны, что подтверждается исследованиями с использованием методов электрофореза и ультрацентрифугирования.

Инсулин умеренно растворим в воде в пределах рН 4,0 – 7,0. Изоэлектрическая точка, в которой происходит осаждение белка, наблюдается при рН=5,3. В присутствии ионов цинка молекулы инсулина осаждаются в виде кристаллов.

Инсулин не имеет белков-переносчиков в плазме, и, выходя из клетки посредством экзоцитоза при слиянии зрелой секреторной гранулы с цитоплазматической мембраной, переносится с током крови [2]. При этом инсулин, попадая в новую среду, т.е. в кровь, теряет свою устойчивую кристаллическую конформацию, распадаясь на биологически активные молекулы при отщеплении цинка.

Фрагментация и распад инсулина главным образом осуществляется в почках, печени, плаценте [3].

Так как препараты инсулина чаще вводятся парентерально (подкожно) [4], возникает вероятность изменения физико-химических свойств тканей, в том числе крови, поскольку сразу после инъекции концентрация препарата в месте введения препарата высока. В связи с этим целесообразно изучать влияние препаратов инсулина на свойства крови.

В качестве объектов исследования использовались: препарат инсулина НовоРапид (инсулина аспарт), человеческий гемоглобин и бычий сывороточный альбумин.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) – слабокислый белок крови животных и человека, составляющий около 55 – 70% от общего состава плазмы. Концентрация в плазме – 35-55 мг/мл. В воде растворим. Как наиболее распространенный белок плазмы с сильным отрицательным зарядом, альбумин также в значительной степени отвечает за коллоидосмотическое давление или за втягивание воды в систему кровообращения через капилляры [5-9].

Будучи основным компонентом плазмы крови, БСА в рамках данного исследования использовался в качестве средообразователя.

Вязкость является характеристикой коллоидной системы, определяющей её реологические свойства. Основное влияние на вязкость оказывает межмолекулярное взаимодействие, ограничивающее подвижность молекул [10]. В первой части эксперимента исследовалась зависимость вязкости бычьего сывороточного альбумина (БСА) – аналога человеческого сывороточного альбумина от pH модельного раствора при введении разного числа единиц препарата ультракороткого действия НовоРапид (инсулина аспарт).

На графическом представлении результатов исследования видно, что добавление инсулина практически не повлияло на ход зависимости вязкости от pH. Из этого можно сделать вывод, что введение инсулина не влияет в целом на реологические свойства крови.

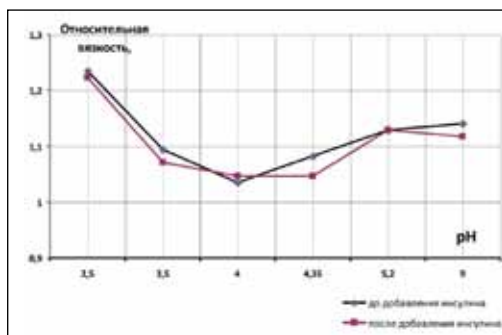


Рис. 1. Исследование влияния инсулина на вязкость растворов БСА

Также в ходе приготовления модельных растворов БСА с различным уровнем pH было установлено, что его изоэлектрическая точка близка к изоэлектрической точке инсулина: осаднения наблюдались соответственно при pH=5,2 и pH=5,3.

Так как белки, в том числе БСА и инсулин, являются типичными поверхностно-активными веществами, при их растворении поверхностное натяжение на раздэле двух фаз понижается.

В ходе эксперимента было установлено, что при добавлении одинакового количества инсулина к различным концентрациям альбумина поверхностное натяжение увеличивается. Измерение проводилось с помощью тензиометра Дю-Нуи.

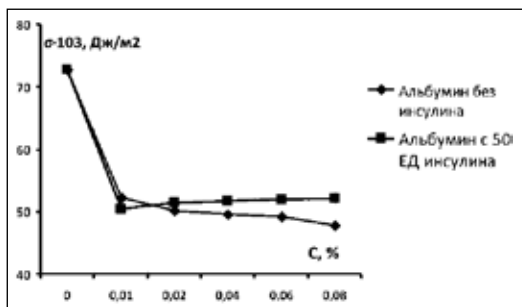


Рис. 2. Исследование влияния инсулина на поверхностное натяжение растворов БСА

При сахарном диабете из-за недостатка гормона инсулина глюкоза накапливается в плазме крови. Это приводит к ее проникновению в эритроциты и гликозилированию их основного белка – гемоглобина. Гемоглобин – белок эритроцитов, представленный 2-α и 2-β полипептидными цепями и железосодержащим небелковым компонентом – гемом. Эритроциты, содержащие гликозилированный гемоглобин, обладают измененным поверхностным электрокинетическим потенциалом, что приводит к их агглютинации, вследствие чего может возникнуть микротромбоз, приводящий к возникновению местной гипоксии. Известно, что эритроциты могут специфически связывать инсулин, поскольку на их мембранах экспонированы рецепторы к нему. Также было доказано содержание инсулина внутри эритроцитов и инсулин расщепляющих протеиназ [11].

Для исследования коллоидного раствора, содержащего гемоглобин и препарат инсулина, в данной работе был выбран метод макроэлектрофореза (метод подвижной границы), позволяющий определить электрокинетический потенциал модельного раствора.

Электрокинетическим потенциалом называется потенциал коллоидной частицы; он характеризует работу переноса ионов из глубины

раствора на плоскость скольжения и зависит от концентрации ионов в диффузном слое.

На электрокинетический потенциал гемоглобина может влиять изменение заряда инсулина при изменении pH, а также увеличение концентрации препарата, поскольку в его состав входит большое число электролитов [12]:

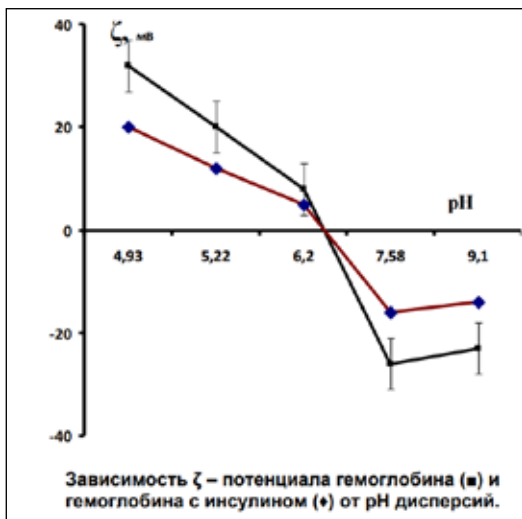


Рис. 3. Исследование влияния препарата инсулина на электрокинетический потенциал гемоглобина

Состав препарата: инсулина аспарт (генно-инженерный), глицерол, фенол, метакрезол, цинка хлорид, натрия гидрофосфата дигидрат, натрия хлорид, натрия гидроксид, хлористоводород-ная кислота, вода для инъекций.

Полученные зависимости электрокинетического потенциала от pH и от концентрации инсулина свидетельствуют, что инсулин понижает значения электрокинетического потенциала, но не влияет на положение изоэлектрической точки гемоглобина.

Выводы:

В ходе проделанной работы можно сформировать несколько выводов. Инсулин аспарт заметно не влияет на реологические свойства и поверхностное натяжение системы, это свидетельствует о том, что данный вид инсулина не изменяет структуру растворов белка крови.

В присутствии инсулина потенциал гемоглобина уменьшается по абсолютной величине, что свидетельствует об адсорбционном взаимодействии инсулина и гемоглобина. Инсулин не влияет на изоэлектрическую точку гемоглобина и адсорбируется как противоион, участвуя в ионном обмене.

Список литературы

1. Эндокринология. Большая медицинская энциклопедия. М. : Эксмо, 2011. 608 с.
2. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: в 2 томах; пер. с англ. Москва : Мир, 1993. Т. 1 / пер.с англ. В. В. Борисова, Е. В. Дайниченко ; под ред. Л. М. Гиномана. 1993. 381 с. : ил., табл.
3. Комов, В. П. Биохимия : учебник для академического бакалавриата / В. П. Комов, В. Н. Шведова. — 4-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2015. — 640 с.
4. Николаева П.А. Сахарный человек. Всё, что вы хотели знать о сахарном диабете 1 типа. СПб. : Питер, 2017. 192 с.
5. Ahrén, B., Burke, V.: Using albumin to improve the therapeutic properties of diabetes treatments// Diabetes, Obesity and Metabolism 14(2): Blackwell Publishing Ltd, 2011 с. 122
6. Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Банкина А.Н., Бриллиантова Е.Ю. Изучение взаимодействия белков с биологически активными азотсодержащими гетероциклическими соединениями при различных значениях рН Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 34. № 5. С. 91-99.
7. Чухно А.С., Банкина А.Н., Бриллиантова Е.Ю. Кинетика процесса набухания желатины в водных растворах азолов. Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 38. № 5. С. 84-88.
8. Дмитриева И.Б., Кергенцев А.А., Чухно А.С.Определение констант диссоциации карбоксильных и аминогрупп на альбумине методом потенциометрического титрования Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 41. № 3. С. 141-146.
9. Родионова Е.Ю., Дмитриева И.Б., Чухно А.С. Влияние состава дисперсионной среды на устойчивость и электрокинетические свойства билирубина. Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 37. № 1. С. 55-61.
10. Антонов В.Ф. и др. Биофизика: учеб. для студентов вузов / под ред. проф. В.Ф. Антонова, — изд. третье, испр. и доп. М. : Гуманитар. изд. центр ВЛАДОС, 2006. 287 с.

11. Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Булаева С.В., Малышева Ю.В., Замышляев А.В. Тромбоз, гемостаз и реология / – 2018.-N 2.- С.46-54

12. Беляев А.П., Кучук В.И. Физическая и коллоидная химия: учебник; под ред. А.П. Беляева. 2-е изд., перераб и доп. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. 752 с.

УДК 547.854.4

***Колесник Д.А., Куваева Е.В., Яковлев И.П.,
Ксенофонтова Г.В., Шапранов Е.Г.***
*ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет (СПХФУ)
Россия, Санкт-Петербург
denis.kolesnik@spcpu.ru, elena.kuvaeva@pharminnotech.com, igor.
yakovlev@pharminnotech.com, galina.ksenofontova@pharminnotech.com,
Shapranov.Egor@pharminnotech.com*

**Синтез новых производных 6-гидроксипиримидин-4(3H)-она
и исследование их биологической активности «in silico»**

В данной работе рассматриваются новые производные 6-гидроксипиримидин-4(3H)-она как перспективные синтоны для создания биологически активных веществ. Целью настоящей работы является разработка метода их получения, доказательство строения и индивидуальности с помощью современных физико-химических методов анализа, а также исследование биологической активности полученных соединений «in silico».

Ключевые слова: производные 6-гидроксипиримидин-4(3H)-она, N-арилбензамидины, метилмалонилхлорид.

***Kolesnik D.A., Kuvaeva E.V., Yakovlev I.P.,
Ksenofontova G.V., Shapranov E.G.***
*St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
Russia, St. Petersburg*

**Synthesis of new 6-hydroxypyrimidine-4(3H)-one derivatives and study
of their biological activity «in silico»**

In this paper, 6-hydroxypyrimidine-4 (3H)-one derivatives are considered as promising syntones for the creation of new biologically active substances. The purpose of the present work is to develop a method for producing, proving

structure and individuality using modern physicochemical analysis methods, as well as the study of the biological activity of the obtained compounds.

Key words: *derivatives of 6-hydroxypyrimidine-4(3H)-one, N-arylbenzamidines, methylmalonylchloride.*

Введение. Одной из важнейших задач для современной науки является поиск инновационных соединений, превосходящих по фармакологическим и терапевтическим свойствам уже известные, и которые могли бы найти место в лечении различных заболеваний. Перспективным направлением является разработка методов получения новых производных 6-гидроксипиримидин-4(3H)-она и изучение их биологической активности [1].

На фармацевтическом рынке представлен широкий спектр различных по своим терапевтическим и фармакологическим свойствам препаратов, содержащих в основе ядро пиримидина. Ряд широко используется в противоопухолевой терапии – метотрексат, тегафур, иматиниб, другие находят применение в противовирусной терапии при ВИЧ-инфекции – ставудин, ламивудин, зидовудин, а такие препараты, как ацикловир, валацикловир и индоксуридин применяют для лечения заболеваний, вызванных различными видами вируса герпеса [2]. Такое вещество как диоксометилтетрагидропиримидин используется в терапии вялотекущих анаболических процессов (лёгкие формы лейкопении, лучевые поражения и другие).

Синтез производных 6-гидроксипиримидин-4(3H)-она является перспективным направлением с точки зрения поиска и создания эффективных лекарственных препаратов на их основе. В данной работе представлен подход к синтезу новых 3-R-6-гидрокси-5-метил-2-фенилпиримидин-4(3H)-онов (**III a-g**), доказательство их строения и индивидуальности с помощью физико-химических методов идентификации органических соединений.

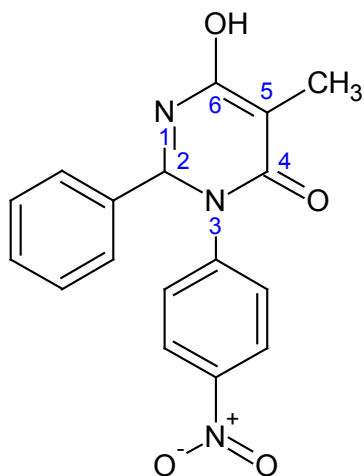
Экспериментальная часть. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C растворов веществ в DMSO-d_6 записаны на спектрометре *Bruker AM-500*, спектральные данные обработаны с помощью программы *MestReNova*.

Контроль за ходом реакции, чистотой и индивидуальностью полученных соединений осуществлялся с помощью ТСХ на пластинах *Sorbfil®* в системе метанол – дихлорэтан (1:9). Детекция пятен на хроматограммах, осуществлялась с помощью ультрахемископа «Хроматоскоп» при длине волны 254 нм. Скрининг биологической активности проводился с использованием пакета программ *PASS*.

Синтез 3-(4-«R»фенил)-6-гидрокси-5-метил-2-фенилпиримидин-4(3H)-онон. К суспензии 0,03 моль *N*-арилбензолкарбоксимидамида (**I а-г**) в 20 мл абсолютного *o*-ксилола с помощью капельной воронки прикапывают раствор 0,039 моль свежеперегнанного метилмалонилхлорида (**II**) в 15 мл абсолютного *o*-ксилола при комнатной температуре и постоянном перемешивании. По завершении прикапывания, реакционную массу кипятят при температуре 144 °С с обратным холодильником в течение 4 часов до прекращения выделения хлороводорода. По истечении указанного времени *o*-ксилол отгоняют. Колбу с сухим остатком охлаждают. Затем к нему прибавляют 20 мл 10% раствора натрия гидроксида, смесь перемешивают в течение 30 минут, затем фильтруют. Фильтрат подкисляют разбавленной соляной кислотой (7%) до pH=4.0.

Формируется осадок целевого продукта. Спустя 20 минут суспензию отфильтровывают, высушивают.

Состав синтезированных соединений был подтвержден элементным анализом. Например, для соединения 6-гидрокси-5-метил-3-(4-нитрофенил)пиримидин-4(3H)-он (**III г**) брутто-формула: C₁₇H₁₃N₃O₄. Найдено %: С – 62.53, Н – 3.65, N – 12.50, O – 18.90; вычислено %: С – 63.16, Н – 4.05, N – 13.00, O – 19.80. Данные элементного анализа, выходы целевых продуктов и величина R_f для соединений **III а-г** представлены в табл. 1.



Строение всех полученных веществ было доказано с помощью спектроскопии ЯМР ¹H и ¹³C, а также масс-спектрометрии (табл. 2).

Так, например, для соединения **III г** спектр ЯМР ¹H в ДМСО-*d*₆ характеризуется наличием резонансных сигналов протонов двух бензольных колец (7.24-8.14 м.д.) при «C₂» и «N₃»; сигнала протонов группы -CH₃ (с. 1.89 (3H)) при «C₅» и сигнала протона -OH группы при «C₆» (с. 11.59 (1H)) (рисунок 1).

Рис. 1. Структурная формула 6-гидрокси-5-метил-3-(4-нитрофенил)пиримидин-4(3H)-она (**III г**)

Таблица 1. Данные элементного анализа, выход, и величина R_f соединений III а-г

Со-единение	Rf	Выход, %	Найдено, %				Брутто-формула	Вычислено, %					
			С	Н	О	Br		С	Н	О	Br		
III а	0,74	69	73,21	5,00	10,0	11,36	-	C17H14N2O2	73,37	5,07	10,07	11,5	-
III б	0,71	71	72,55	4,16	8,34	9,76	-	C18H16N2O2	73,95	5,52	9,58	10,95	-
III в	0,70	64	56,18	3,25	7,05	8,22	21,8	C17H13N2O2Br1	57,16	3,67	7,84	8,96	22,37
III г	0,74	60	62,53	3,65	12,5	18,9	-	C17H13N3O4	63,16	4,05	13,0	19,8	-

Таблица 2. Данные ЯМР 1H , ^{13}C и масс-спектров соединений III а-г ДМСО- d_6

Соединение	Спектр ЯМР 1H (ДМСО- d_6), дм, д,			Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ, м.д.						m/z
	СН3	Ar	ОН	СН3	Ar	С2	С4	С5	С6	
III а	1,88	7,20-7,31	11,49	8,96	128,01-138,34	156,80	164,46	96,41	164,01	278
III б	1,89 2,24	7,10-7,47	11,49	8,96 20,45	128,04-138,33	156,91	164,43	96,45	163,74	292
III в	1,87	7,23-7,57	11,54	8,97	126,30-130,58	151,30	163,23	96,53	163,42	357
III г	1,89	7,24-8,14	11,59	8,98	128,30-138,58	150,42	164,23	96,43	164,40	323

В спектре ЯМР C^{13} соединения **III (г)** помимо сигналов атомов углерода бензольных колец в области 128.30-138.54 м.д. и сигнала метильной группы 8.98 м.д., в слабом поле при 164.23 м.д. и 164.40 м.д. наблюдаются сигналы атомов углерода C_4 и C_6 соответственно, а также сигналы атомов углерода C_2 – 140.42 м.д. и C_5 – 96.43 м.д. (рисунок 1).

Строение веществ **III (а-г)** подтверждено данными масс-спектрометрии. Рассчитанные молекулярные массы полностью совпали с экспериментально полученными.

Данные спектральных характеристик и масс-спектры соединений **III (а-г)** представлены в табл. 2.

Результаты и их обсуждение

3-(4-«R»фенил)-6-гидрокси-5-метил-2-фенилпиримидин-4(3H)-оны (**III а-г**) были получены взаимодействием *N*-арилбензолкарбосимидамида (**I а-г**) со свежеперегнанным метилмалонилхлоридом (**II**) в среде абсолютного *o*-ксилола с выходами 60-71% (схема 1).

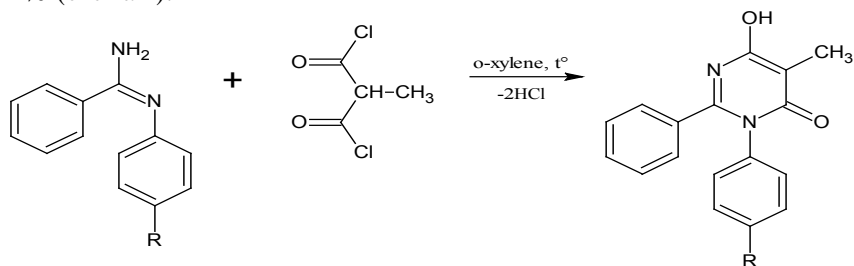


Схема 1. Синтез 3-(4-«R»фенил)-6-гидрокси-5-метил-2-фенилпиримидин-4(3H)-онов

I (а-г) II III (а-г)

где R = -H (а); -CH₃ (б); -Br (в); -NO₂ (г)

Установлено, что максимальные выходы продуктов **III а-г** (60-71%) достигаются при постоянном перемешивании суспензии *N*-арилбензолкарбосимидамида (**I а-г**) с добавляемым раствором метилмалонилхлорида (**II**) в *o*-ксилоле и дальнейшим нагреванием реакционной массы при 144 °С в течении 4 часов. Причем с наиболее низкими выходами образуются 3-(4-«R»фенил)-6-гидрокси-5-метил-2-фенилпиримидин-4(3H)-оны, имеющие в бензольном кольце при атоме «N₃» электроноакцепторные заместители (-Br / -NO₂).

Для синтезированных соединений был проведен скрининг возможной биологической активности «in silico» при помощи пакета

программ PASS. Данный ресурс позволяет предсказать спектр активности химических соединений на основе анализа взаимосвязей «структура – активность» в обучающей выборке [3]. Результаты скрининга представлены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты прогноза биологической активности «in silico» для соединений III (а-г)

Соединение	Вероятность проявления эффекта	Вид активности
III а	0,655	Стимуляция функции почек
	0,546	Стимуляция лейкопоеза
	0,544	Стимуляция эритропоеза
	0,300	Противовоспалительная
	0,203	Анальгетическая
III б	0,619	Стимуляция функции почек
	0,529	Промоция инсулина
	0,508	Антагонизм к тромбоксану В2
	0,303	Противовоспалительная
III в	0,659	Стимуляция функции почек
	0,255	Противовоспалительная (офтальмология)
III г	0,532	Антагонизм к тромбоксану В2
	0,523	Стимуляция функции почек
	0,205	Аналептическая

Скрининг показал, что полученные вещества с достаточно высокой вероятностью могут обладать анаболической активностью. Однако предсказываются и активности с низкой вероятностью (аналь-

гетическая и противовоспалительная). С точки зрения перспективы разработки и внедрения новых лекарственных средств интерес представляют не только те виды биологической активности, достоверность прогноза которых для данного соединения высока, но и те, для которых она низка. Поэтому упоминать о них целесообразно.

Заключение

Получены новые, ранее не описанные в литературе, 3-(4-«R»фенил)-6-гидрокси-5-метил-2-фенилпиримидин-4(3*H*)-оны. Описана методика синтеза, приведено доказательство строения полученных соединений, а также осуществлён скрининг биологической активности «in silico».

Список литературы

1. Ajmal R. Bhata, Rajendra S. Dongrea, Gowhar A. Naikoob, Israr U. Hassanb, TabassumArac. Proficient synthesis of bioactive annulated pyrimidine derivatives: A review. Journal of Taibah University for Science. November.2017.Vol.11. Iss.6. P.1047-1069.
2. Самотруева М.А., Цибизова А.А., Ясенявская А.Л., Озеров А.А., Тюренков И.Н. Фармакологическая активность производных пиримидинов. Астраханский медицинский журнал.2015. №1. С.7-24.
3. PASS. URL: <http://www.way2drug.com/PASSOnline/info.php> [Дата обращения – 17.08.2020]

УДК 615.099.07

Крысько М.В., Стрелова О.Ю.
*ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет (СПХФУ)
Россия, Санкт-Петербург
krysko.marina@pharminnotech.com*

Проведение сегментационного анализа волос с применением ферментативного гидролиза папаином

При контроле ремиссии у пациентов врачами психиатрами-наркологами рекомендуется проводить химико-токсикологический анализ волос, что позволит установить эпизодическое или хроническое употребление (без выраженной клинической картины) психоактивных веществ. В качестве метода изолирования использовали ферментативный гидролиз папином с последующей жидкость-жидкостной экстракцией.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, волосы, сегментационный анализ, фенобарбитал, димедрол.

Krysko M.V., Strelova O. Yu.
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
Russia, St. Petersburg

Segmentation hair analysis using enzymatic hydrolysis by papain

When monitoring remission in patients by psychiatrists-narcologists, it is recommended to carry out a chemical-toxicological analysis of hair, which will make it possible to establish episodic or chronic use (without a pronounced clinical picture) of psychoactive substances. Enzymatic hydrolysis by papain with liquid-liquid extraction was used as the isolation method.

Keywords: enzymatic hydrolysis, hair, segmentation analysis, phenobarbital, diphenhydramine.

Диагностику наркотической зависимости проводят по нескольким критериям, одним из которых является обнаружение психоактивных веществ и их метаболитов в биологическом материале (слюна, моча, пот, кровь, волосы, ногти) [1, 2, 3].

Целый ряд факторов, таких как свойства токсического вещества, его доза, физиологические параметры и состояние организма человека, влияют на период, через который можно определить содержание токсиканта. Согласно данным литературы, сроки обнаружения токсиканта в различных биологических объектах отличаются. Так в волосах лица (бороды) токсикант может быть обнаружен спустя 2-3 дня, в волосах головы спустя 5–7 дней, в то время как в моче, слюне и поте уже через 0,5–60 мин после приема [4, 5].

Анализ мочи может предоставить лишь кратковременную информацию об употреблении токсикантов, в то время как результаты анализа образцов волос позволяют сделать вывод о давности и продолжительности их приема [5]. Значительные различия в интервалах времени, в течение которых токсиченские вещества обнаруживаются в моче и волосах, позволяют с большей вероятностью установить факт их употребления.

Эксперимент проводили на лабораторных животных – морских свинках, которым в течение шести месяцев ежедневно перорально вводили раствор фенобарбитала в концентрации 7 мг/кг и раствор дифенгидрамина гидрохлорида в концентрации 10 мкг/кг. После указанного периода животным прекратили ввод препаратов и в течение

двух недель собирали суточную мочу. Извлечение из мочи проводили методом прямой жидкость-жидкостной экстракцией (ЖЖЭ) хлороформом порциями по 2 мл 3 раза при pH 2 и pH 9 [6]. Полученные вытяжки объединяли и выпаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 600 мкл комплексного растворителя (дихлорметан, дихлорэтан, гептан, пропанол-2) и исследовали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХМС) на приборе Agilent 5977 MSD [7]. Количественное определение модельных лекарственных веществ в анализируемых пробах проводили по градуировочному графику. Методика количественного определения была валидирована ранее [7, 8].

Полученные результаты показали, что анализ мочи позволяет обнаружить фенобарбитал только в течение 11 дней после последнего приема препарата, а дифенгидрамина – на 4 сутки, что согласуется с данными литературы о фармакокинетических параметрах данных веществ [9].

Отбор шерсти у животных проводили на 28 день после прекращения употребления модельных лекарственных веществ. Средняя длина шерсти составила 3 см. Полученные образцы шерсти разделили на 2 равные части, примерно по 1,5 см на прикорневой и концевой сегменты. Полученные навески шерсти промывали от внешних загрязнений метанолом, затем измельчали до порошкообразной массы [10].

Ферментативный гидролиз папаином выполняли в следующих условиях: 0,5 мг/мл раствор папаина (1:100) в ацетатном буфере pH 4,7, содержащим 0,1% раствор трилона Б и 0,1% раствора цистеина и около 0,4 г (точная навеска) порошка шерсти помещали в коническую пробирку, плотно закупоривали, перемешивали и термостатировали при 37 °С 3 ч, пробы центрифугировали, центрифугат отбирали. К осадку добавляли вторую порцию раствора фермента в равном объеме, перемешивали и термостатировали следующие 3 ч в аналогичных условиях. Общее время гидролиза составило 6 ч. К центрифугату добавляли 20% раствор серной кислоты до pH 2 (для фенобарбитала) или 25% раствор аммиака до pH 9-10 (для дифенгидрамина). Экстракцию хлороформом повторяли 3 раза порциями по 3 мл. Полученные вытяжки объединяли и выпаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 600 мкл комплексного растворителя и исследовали методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием [7, 10].

Анализ хроматограмм показал, что пики фенобарбитала и дифенгидрамина на уровне предела обнаружения. Данный факт затрудняет

проведение количественного анализа, но позволяет зафиксировать факт употребления вещества. Таким образом, установлено, что проведение сегментационного анализа образцов волос возможно только с целью установления факта употребления психоактивных веществ в определенный промежуток времени (с учетом скорости роста волоса). На возможность обнаружения токсиканта будут влиять его токсикокинетические особенности. Проведенное исследование показало, что фенобарбитал, имеющий периодом полувыведения около 70-100 ч преимущественно накапливается в прикорневом сегменте. За этот период времени он успевает накопиться в тканях организма, в том числе и в волосах, которые отрастали в течение 28 дней. Тогда как лекарственные вещества с коротким периодом полувыведения (дифенгидрамин, до 9 ч) в большей степени накопился в концевом сегменте [9]. Фенобарбитал накапливается в существенно более высоких концентрациях, чем дифенгидрамин. Основание димедрола (дифенгидрамин) быстро метаболизирует с образованием гидрофильных метаболитов, практически не накапливается в тканях [9, 11].

Результаты исследования показали (рис. 1), что анализ образцов шерсти после проведения ферментативного гидролиза по сравнению с исследованиями проб мочи позволяет не только установить факт употребления психоактивного вещества, но и выявить периодичность и срок давности их приема [11].

С целью реализации задачи по апробации предлагаемого подхода и внедрения его в практику были проанализированы волосы от освидетельствуемых лиц. Прясть волос пациентки «В» длиной 25 см разделили на 3 сегмента (рис. 3). Пробоподготовку образцов проводили методикой ферментативного гидролиза папаином, экстракты из образцов исследовали методом ГХ-МС (рис. 2). После проведения ферментативного гидролиза в экстрактах из всех трех сегментах были обнаружены никотин и фенобарбитал.

В данном случае было возможно выполнить количественное определение фенобарбитала. Установили, в экстракте из прикорневого сегмента (3 см) обнаружено 7,1 нг/мг, в следующем сегменте (3 см) – 5,8 нг/мг и в оставшемся концевом сегменте (19 см) – 3,7 нг/мг. На основании данных результатов было установлено, что пациентка «В» принимает фенобарбитал регулярно.

Полученные результаты показали, что ферментативный гидролиз неспецифичной протеазой, папаином, позволяет проводить скрининговое исследование проб волос с целью установления срока давности приема.

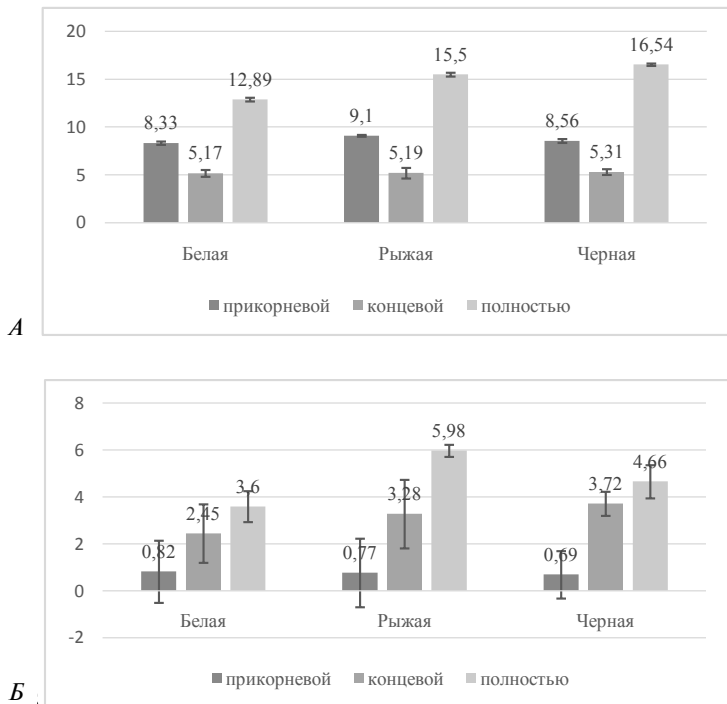
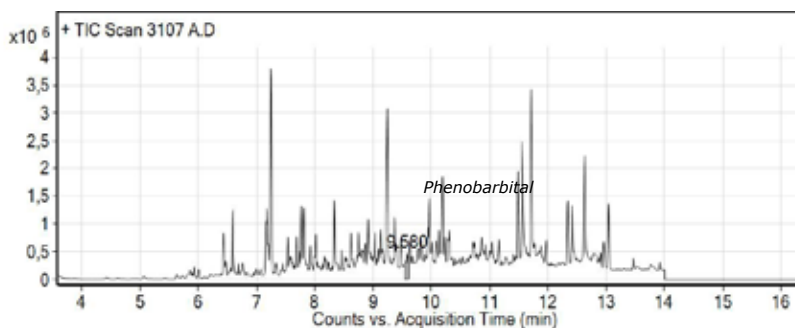


Рис. 1. Количественное содержание фенобарбитала (А) и дифенгидрамина (Б) (нг/мг) в экстрактах из образцов шерсти после сегментационного анализа



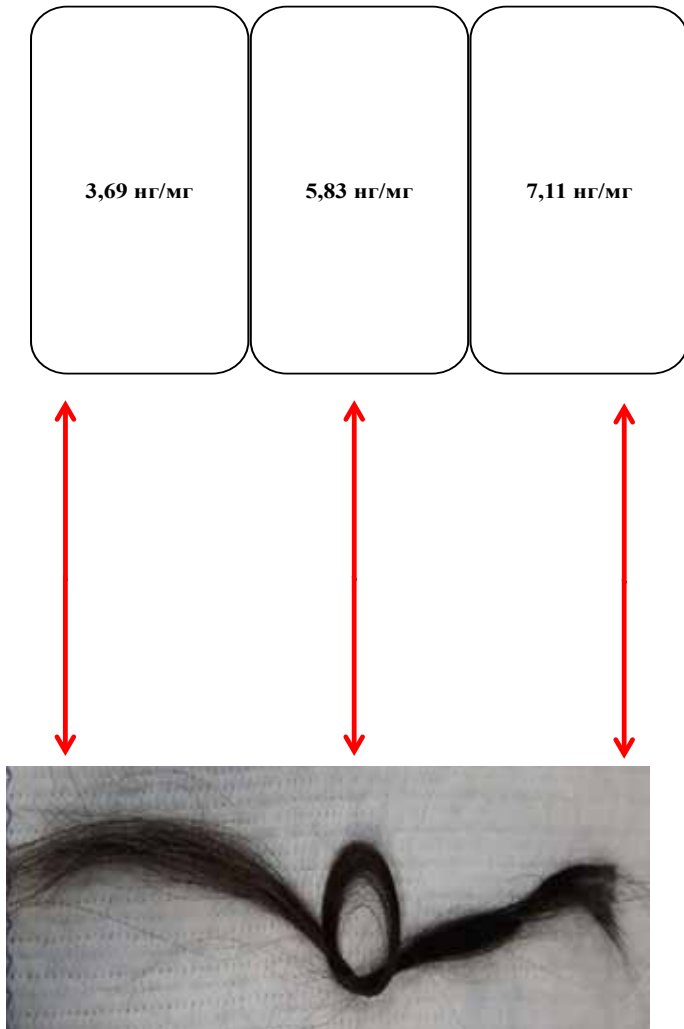


Рис. 3. Биологический материал пациентки «В»

Список литературы

1. Слустовская, Ю.В. Исследование волос с целью диагностики употребления психоактивных веществ / Слустовская Ю.В., Стрелова О.Ю., Крысько М.В., Куклин В. Н. // «Вестник Российской военно-медицинской академии» 2019; №1: 120-126.
2. Руденко, Б.А. Химико-аналитическое определение наркотических и допинговых средств / Б. А. Руденко [и др.]. М.: «Нарконет», 2007. 367 с.
3. Nakahara, Y. Hair analysis for drugs of abuse XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. / Y. Nakahara, K. Takahashi, R. Kikura // Arch Toxicol. 1996. № 70(12). P. 841–849.
4. Kintz, P. Analytical and practical aspects of drug testing in hair / ed. by P. Kintz. New York: Taylor & Francis Group, 2007. 382 p.
5. Симонов, Е.А. Наркотики: методы анализа на коже, в её придатках и выделениях / Е.А. Симонов, Б.Н. Изотов, А.В. Фесенко.— М.: «Анахарсис», 2000. — 130 с.
6. Лобан, И.Е. Судебно-медицинское выявление фенобарбитала в моче/ И.Е. Лобан [и др.] // Вестник судебной медицины. — 2016. — № 2 том 5. — С. 45-48.
7. Слустовская, Ю.В. Разработка методики ферментативного гидролиза для изолирования токсичных веществ из образцов волос / Ю.В. Слустовская, М.В. Крысько, О.Ю. Стрелова // Судебно–медицинская экспертиза. 2017. №2(60). С. 36-40.
8. Крысько, М. В. Апробация методики ферментативного гидролиза на природно и искусственно окрашенных волосах для изолирования лекарственных веществ / М.В. Крысько, В.Ю. Слустовская, О.Ю. Стрелова, В.Н. Куклин // Научные Ведомости. Серия Медицина. Фармация. 2018. № 4(41). С. 659-671
9. Moffat, A. C. Clarke's analysis of drug and poisons / A.C. Moffat, M. D. Osselton, V. Widdop, J. Watts. 4th edition. London: The Pharmaceutical press, 2011. 2609 p.
10. Крысько, М.В. Определение срока давности приема лекарственных веществ по волосам для диагностики интоксикации / М.В. Крысько, Ю.В. Слустовская, О.Ю. Стрелова, В.Н. Куклин // Фармация. 2020. № 5 (69). С. 43-50.
11. Крысько, М.В. Обнаружение фенобарбитала в биологических объектах (моча, волосы) с целью установления срока давности приёма. / М.В. Крысько // Материалы Международной научной конференции «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2019 г. СПб.: Изд-во СПХФУ, 2019.—С.119-121

УДК 616-053.4

*Кулешов Д.О.¹, Кулешова Т.Э.², Галль Л.Н.¹
Институт аналитического приборостроения РАН¹
Россия, Санкт-Петербург
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН²
Россия, Санкт-Петербург
hellchemist@yandex.ru*

Унитиоловый тест: инструмент изучения влияния слабых физических факторов на живые организмы

Унитиоловый тест нашел широкое применение в изучении влияния геомагнитных и космофизических факторов на живые организмы. В настоящей работе представлены результаты исследования водных растворов унитиола методами масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией и динамического рассеяния света.

Ключевые слова: *унитиоловый тест, слабые физические фактор, масс-спектрометрия, динамическое рассеяние света.*

*Kuleshov D.O., Kuleshova T.E., Gall L.N.
hellchemist@yandex.ru, Kuleshov D.O.*

Unithiol test: a tool for investigating the influence of weak physical factors on living organisms

Unithiol test is widely used for study of influence on living organisms of geomagnetic and space physical factors. This paper presents the results of studies of unithiol's aqueous solutions using mass spectrometry with electrospray ionization and dynamic light scattering.

Key words: *Unithiol test, weak physical factors, mass spectrometry, dynamic light scattering.*

Среди биологически активных веществ, специфичных для химического состава живых организмов, повышенный интерес вызывают тиоловые соединения. Совокупность реакционноспособных тиоловых соединений, находящихся в организме в данный момент в восстановленном и окисленном состояниях, и сохраняющих способность к их изменению – окислению или восстановлению, представляет собой так называемую тиол-дисульфидную систему (ТДС) организма. В.В.Соколовским было показано [1], что состояние ТДС может быть количественно охарактеризовано отношением концентраций сульфгидрильных групп к дисульфидным, т.е. величиной тиол-дисуль-

фидного отношения (ТДО), являющегося интегральным показателем реакции организма на действие окружающей среды. Используя ТДО в качестве инструмента для оценки состояния живого организма, В.В.Соколовский впервые доказательно связал между собой изменение процессов жизнедеятельности под действием солнечной активности, раскрыв, тем самым, биологический механизм влияния внешних физико-химических и космогеофизических факторов на физиологическое состояние живого организма. Исследования в этом направлении базировались на регистрации изменения ТДО крови и корреляции с изменением внешних факторов, воздействующих на организм человека, выступающий в данном случае в качестве биологического теста [2]. Им же была предложена модельная химическая система для изучения реакции ТДС на влияние внешних химических, физических и биологических факторов [3]. Модельная система («унитиоловый тест») представляет собой реакцию окисления унитиола (2,3-димеркаптопропансульфоната-1 натрия) нитритом натрия, причем за количественный критерий принято время полуокисления тиоловых групп унитиола (ВПОУ). Полная корреляция между величинами ТДО и ВПОУ подтверждена в многолетних экспериментах группы В.В.Соколовского [3].

На основании исследований В.В. Соколовского можно заключить, что ТДС организма и унитиоловый тест являются химическими системами, откликающимися на действие слабых физических факторов. В настоящее время биофизика уделяет пристальное внимание изучению влияния слабых физических факторов на процессы, протекающие в молекулярных системах живых организмов, однако, на сегодняшний день понимание физико-химических механизмов биологического действия слабых естественных и искусственных факторов отсутствует [4]. Таким образом, актуальной является задача изучения биохимических процессов, откликающихся на действие слабых факторов различного происхождения с целью определения механизма их биологического действия.

С целью детального понимания протекания реакции окисления унитиола нитритом натрия нами были проведены масс-спектрометрические исследования водных и водно-ацетонитрильных растворов унитиола. Было обнаружено, что унитиол присутствует в водных и водно-ацетонитрильных растворах в виде ассоциатов общей формулы $(C_3H_7O_3S_3Na)_nNa^+$, где наблюдаемое значение n достигало 8; так же было обнаружено, что продукты окисления унитиола способны к образованию ассоциатов с мономерами унитиола [2].

Полученные масс-спектрометрические данные позволили сделать предположение о наличии у унитиола поверхностно-активных свойств, а также о возможности существования в водных растворах унитиола мицелл и ассоциатов с большими числами агрегации. Это предположение было проверено методами динамического светорассеяния (Zetasizer Nano ZSP, Malvern Instruments) и тензиометрии (Sigma 720 ET, KSV Instruments). Установлено, что унитиол является поверхностно-активным веществом и его критическая концентрация мицеллообразования имеет значение 0,3 моль/л. Показано, что в диапазоне концентраций 0,1 М – 1 М в водных растворах унитиола присутствуют частицы размером 0,5 – 2 нм, представляющие собой мицеллы. В диапазоне концентраций 10^{-6} – 10^{-2} М водные растворы унитиола имеют бимодальное распределение рассеивающих частиц по интенсивности и по объему с преобладанием частиц размером 50-500 нм, представляющих собой супрамолекулярные домены, образованные молекулами унитиола и молекулами воды.

Т.о., на основании полученных данных можно сделать вывод, что в области концентраций, в которой осуществляется проведение унитиолового теста (начальная концентрация унитиола в унитиоловом тесте – $5 \cdot 10^{-4}$ М), унитиол образует супрамолекулярные домены с размерами от 50 до 500 нм. Реакционная способность тиоловых групп унитиола зависит от структуры супрамолекулярных доменов, на которую могут оказывать влияние внешние слабые факторы.

Список литературы

1. Соколовский В. В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальное воздействие //Вопросы медицинской химии. 1988. Т. 34. №. 6. С. 2-11.
2. Кулешов Д. О., Кулешова Т. Э., Бобков Д. Е., Дьяченко А. А., Галль Н. Р., Галль Л. Н. Масс-спектрометрическое изучение водно-ацетонитрильных растворов унитиола //Научное приборостроение. 2018. Т. 28. №. 3. С. 72-83.
3. Соколовский, В.В. Тиолдисульфидная система в реакции организма на факторы окружающей среды / В.В. Соколовский. СПб: Наука, 2008. 112 с.
4. Бинги, В. Н. Принципы электромагнитной биофизики / В.Н. Бинги. Москва: Литрес, 2011. 592 с.

УДК 544.165

*Мартынова Ю.З., Хайруллина В.Р.,
Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г.*
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»
Россия, Уфа
Martynova YuZ@gmail.com

Виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов дезоксидинтрифосфатазы

С использованием программы GUSAR 2019 на основе MNA- и QNA-дескрипторов построено 6 статистически значимых консенсус-моделей прогноза численных значений IC_{50} для производных урацила в отношении дезоксиридинтрифосфатазы. Эти модели QSAR применимы в диапазоне значений величины $IC_{50} 30 \div 185000$ нмоль/л.

Ключевые слова: ингибиторы, дезоксиридинтрифосфатазы, QSAR, GUSAR 2019, QNA- и MNA-дескрипторы, «структура – активность».

*Martynova Y.Z., Khairullina V.R.,
Gimadieva A.R., Mustafin A.G.*
Bashkir State University
Russia, Ufa

Virtual screening of potential deoxyuridintriphosphatase inhibitors

Using the GUSAR 2019 program, 6 statistically significant consensus models for predicting the numerical values of IC_{50} for uracil derivatives with respect to deoxyuridine triphosphatase were constructed on the basis of MNA and QNA descriptors. These models can be applied by, in the range of IC_{50} values $30 \div 185000$ nmol/l.

Key words: inhibitors, deoxyuridine triphosphatase, QSAR, GUSAR 2019, QNA and MNA descriptors, structure–activity.

Фермент дезоксиридинтрифосфатаза (dUTPase) относится к семейству гидролаз. dUTPase катализирует реакцию гидролиза дезоксиридинтрифосфата (dUTP) с образованием дезоксиридинмонофосфата (dUMP) и пирофосфат-аниона (PPi), где dUMP – является субстратом для другого жизненно важного фермента – тимидилат-синтазы, непосредственно участвующей в синтезе дезокситимидинмонофосфата [1-2]. В дальнейшем дезокситимидинмонофосфат в результате фосфорилирования превращается в dUTP, представляющий собой одно из мономерных звеньев молекул ДНК [3]. Таким образом,

dUTPase требуется не только для биосинтеза дезокситимидинтрифосфата, но также для поддержания целостности геномной ДНК и способствует снижению уровня мутаций в ее молекулах.

В связи с повсеместной распространенностью dUTPase рассматривается современными биохимиками и медиками как перспективная мишень для разработки лекарственных средств широкого спектра действия: противоопухолевых, противовирусных (в том числе и против вируса СПИДа), антибактериальных, противомаларийных. Ожидается, что терапевтическое действие этих препаратов будет осуществляться благодаря подавлению ими биосинтеза ДНК в различных вирусах, бактериях и простейших, а также в опухолевых клетках. Таким образом, поиск эффективных ингибиторов dUTPase является не только фундаментальной, но и практически важной задачей медицинской химии и биохимии [4].

Однако рациональный поиск новых лекарств без привлечения различных методов виртуального скрининга не возможен как с экономической точки зрения, так и из-за высоких временных затрат. Одними из перспективных подходов для поиска соединений-хитов в этом направлении рассматриваются методы QSAR-методологии, которые позволяют осуществлять экспрессный отбор структур с заданным комплексом свойств для доклинических испытаний.

В связи с этим, целью настоящей работы было установление количественной связи «структура – активность» ингибиторов dUTPase в ряду некоторых производных урацила с общей структурной формулой (рис. 1).

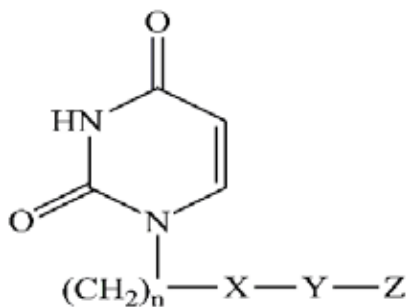


Рис.1. Общая структурная формула ингибиторов dUTPase, вошедших в обучающие массивы OB1 и OB2, где $n=1-3$; X – связь с атомом кислорода, серы или т.п.; Y – линейная или разветвленная алкиленовая группа, имеющая от 1 до 8 атомов углерода, или т.п.; и Z – $-\text{SO}_2\text{NR}_1\text{R}_2$ или $-\text{NR}_3\text{SO}_2\text{-R}_4$, где R1 и R2 – алкильная группа, имеющая от 1 до 6 атомов углерода, аралкильная группа, которая необязательно замещена, или т.п.; R3 – алкильная группа, имеющая от 1 до 6 атомов углерода, или т.п.; и R4 – ароматическая углеводородная группа, ненасыщенная гетероциклическая группа или т.п.

Методика эксперимента

Количественный анализ взаимосвязей «структура-активность» для ингибиторов dUTPase проводили с использованием компьютерной программы GUSAR 2019 (General Unrestricted Structure Activity Relationships) [5-6]. Построение моделей QSAR выполняли в несколько этапов по методике, подробно описанной в работах [7-8].

Массив данных (МД1) для построения OB1-OB2 и TB1-TB2 формировали на основании литературных данных [3-4]. Обучающая выборка OB1 предназначена для построения моделей QSAR M1-M3 и включает в себя 116 ингибиторов dUTPase. Для проверки моделей M1-M3 использовали внешнюю тестовую выборку TB1. Обе эти выборки получены в результате разделения исходного массива данных МД1 в соотношении 6:1 посредством того, что в TB1 из МД1 переносилось каждое седьмое соединение. Предварительно все структуры массива данных МД1 были ранжированы по возрастанию численного значения IC_{50} .

Из выборки OB1 были получены обучающая выборка OB2 и внутренняя тестовая выборка TB2. Обе эти выборки получены в результате разделения обучающей выборки OB1 в соотношении 6:1. Для построения моделей QSAR использовались данные IC_{50} в моль/л, которые затем были трансформированы в величины pIC_{50} по формуле:

$$pIC_{50} = -\log_{10}(IC_{50})$$

Модели QSAR строили на основе MNA и QNA -дескрипторов. Идеология их расчета приведена в работах [5-8]. Прогностическую способность моделей QSAR оценивали по результатам прогноза параметра IC_{50} для структур как обучающих, так и тестовых выборок.

Результаты и их обсуждение

С использованием консенсус-подхода, реализованного в программе GUSAR 2019 на основе MNA- и QNA-дескрипторов построено 6 моделей QSAR, предназначенных прогноза численных значений IC_{50} для производных урацила в отношении dUTPase. Эти модели QSAR применимы в диапазоне значений величины IC_{50} $30 \div 185000$ нмоль/л. Прогностическая способность построенных моделей QSAR оценена на структурах обучающих и тестовых выборок при скользящем контроле с исключением 20% соединений. Статистические параметры этих моделей, а также характеристики точности предсказанных по ним значений pIC_{50} для ингибиторов dUTPase, входивших в обучающие и тестовые выборки, представлены в табл. 1.

Данные табл. 1 позволяют заключить, что все построенные модели являются валидными и могут быть использованы поиска новых ингибиторов dUTPase в виртуальных библиотеках и базах данных. Они позволяют прогнозировать численное значение IC_{50} (в нмоль/л) для ингибиторов dUTPase в диапазоне величины $\Delta pIC_{50}=3-4$ единицы. В целом, анализ консенсус моделей QSAR, представленных в табл. 1, показал, что устойчивые регрессионные зависимости с приемлемыми статистическими характеристиками ($R^2>0,6$; $Q^2>0,5$) в программе GUSAR могут быть построены как на одном определенном типе, так и на обоих типах дескрипторов (QNA или MNA).

Таблица 1. Статистические характеристики и оценка показателей точности предсказаний значений pIC_{50} для ингибиторов dUTPase по моделям M1–M6

OB	Модель	N	R ² OB	R ² TB	F	S.D.	Q ² TB	V
QSAR-модели, построенные на основе QNA-дескрипторов								
OB1	M1	116	0,975	0,849	15,824	0,476	0,651	15
OB2	M4	100	0,973	0,757	14,676	0,506	0,624	13
QSAR-модели, построенные на основе MNA-дескрипторов								
OB1	M2	116	0,967	0,843	11,544	0,426	0,712	21
OB2	M5	100	0,963	0,777	14,676	0,506	0,976	18
QSAR-модели, построенные на основе QNA- и MNA-дескрипторов								
OB1	M3	116	0,973	0,810	11,913	0,438	0,695	18
OB2	M6	100	0,970	0,784	11,621	0,447	0,690	16

Примечание. N – число структур в обучающей выборке; R^2_{OB} – коэффициент детерминации, рассчитанный для соединений из обучающей выборки; R^2_{TB} – коэффициент детерминации, рассчитанный для соединений из тестовой выборки; Q^2 – коэффициент корреляции, рассчитанный на обучающей выборке при скользящем контроле с исключением по одному; F – критерий Фишера; S.D. – стандартное отклонение, V – число переменных.

Таким образом, подход используемый в программе GUSAR 2019, позволяет с высокой степенью надежности моделировать ингибиторной активность производных урацила в отношении дезоксиуридинтрифосфатазы с целью разработки новых ингибиторов данного фермента.

Работа выполнена при поддержке гранта №19-73-20073 Российского научного фонда.

Список литературы

1. To'th J., Varga B., Kova'cs M., Ma'lna'si-Csizmadia A., Ve'rtesy B.G., Kinetic Mechanism of Human dUTPase, an Essential Nucleotide Pyrophosphatase Enzyme // *J. Biol. Chem.* 2007. V.282. №4. P. 33572–33582.
2. Gadsden M. H., McIntosh E. M., Game J. C., Wilson P. J., Haynes R. H. dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* // *EMBO J.* 1993. V.12. №11. P. 4425–4431.
3. Miyakoshi H., Miyahara S., Yokogawa T., Chong Kh.T., Taguchi J., Endoh K., Yano W., Wakasa T., Ueno H., Takao Y., Nomura M., Shuto S., Nagasawa H., Fukuoka M. Synthesis and Discovery of N-Carbonylpyrrolidine- or N-Sulfonylpyrrolidine-Containing Uracil Derivatives as Potent Human Deoxyuridine Triphosphatase Inhibitors // *J. Med. Chem.* 2012. V.55. №7. P. 2960–2969.
4. Fukuoka M., Yokogawa T., Miyahara S., Miyakoshi H., Yano W., Taguchi J., Takao Y. (2013) Patent №8530490 B2 US, Appl. №12/996,079, United States Patent, 10,09,2013.
5. Хайруллина В.Р., Акбашева Ю.З., Янгирова К.Р., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г., QSAR-моделирование некоторых производных урацила с выраженной ингибиторной активностью в отношении дезоксиуридинфосфорилазы // *Вестник Башкирского университета.* 2018. Т.23. № 4. С. 987-993.
6. Хайруллина В.Р., Акбашева Ю.З., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г., Анализ взаимосвязи «структура-активность» в ряду некоторых производных 5-этилуридина с выраженной противогерпетической активностью // *Вестник Башкирского университета.* 2017. Т.22. № 4. С. 960-965.
7. Мартынова Ю.З., Хайруллина В.Р., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г., QSAR-моделирование ингибиторов дезоксиуридинтрифосфатазы в ряду некоторых производных урацила // *Биомедицинская химия.* 2019. Т.65. №2. С. 103-113.
8. Martynova Y.Z., Khairullina V.R., Biglova Y.N., Mustafin A.G., Quantitative structure-property relationship modeling of the C60 fullerene derivatives as electron acceptors of polymer solar cells: Elucidating the functional groups critical for device performance // *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 2019. V.88. P.49-61.

УДК 544.165

*Мартынова Ю.З., Хайруллина В.Р.,
Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г.*
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»
Уфа
Martynova YuZ@gmail.com

Поиск соединений с противогерпетической активностью среди ингибиторов тимидинкиназы

С использованием программы GUSAR 2019 на основе MNA- и QNA-дескрипторов построено 8 статистически значимых консенсус-моделей прогноза численных значений IC_{50} в ряду производных 5-этилуридина, N2-гуанина и 6-оксопурина с выраженной ингибиторной активностью в отношении тимидинкиназы (ТК) вируса простого герпеса (ВПГ) первого и второго типа человека.

***Ключевые слова:** ВПГ-1, ВПГ-2, QSAR, GUSAR 2019, QNA- и MNA-дескрипторы, «структура – активность».*

Martynova Y.Z., Khairullina V.R., Gimadieva A.R., Mustafin A.G.
Bashkir State University
Russia, Ufa

Search for compounds with anti-herpesvirus activity among thymidine kinase inhibitors

Using program GUSAR 2019 8 statistically significant consensus QSAR models for IC_{50} values for known inhibitors of thymidine kinase (TK) in the series of certain 5-ethyluridine, N2-guanine and 6-oxopurines derivatives with pronounced anti-herpetic activity.

***Key words:** HSV-1, HSV-2, QSAR, GUSAR 2019, QNA and MNA descriptors, structure–activity.*

Герпесвирусная инфекция является одной из наиболее распространенных вирусных инфекций человека. Известно, что герпесвирусную инфекцию вызывают восемь видов вирусов Herpesviridae [1-3]. Наибольшее распространение среди них получил вирус простого герпеса первого типа (ВПГ-1), который обычно находится в латентном состоянии [4]. Однако при снижении иммунитета происходит его активация. Многочисленными клиническими исследованиями показано, что вирус герпеса практически всегда диагностируется у больных с ВИЧ-инфекцией, что осложняет течение этого заболевания.

В настоящее время ведущие фармакологи и биохимики при поиске и разработке новых лекарственных средств ориентируются на результаты виртуального скрининга, для практической реализации которого необходимо исследователям иметь в своем арсенале прогностически значимые модели QSAR, позволяющие отбирать соединения-хиты для синтеза и фармакологических исследований. В этой связи целью настоящей работы было построение и валидация моделей QSAR, ориентированных на прогноз и отбор селективных ингибиторов ТК в ряду некоторых карбоксамидных производных 5'-амино-2',5'-дидезокси-5-этилуридина, N2-фенилгуанина, 2-фениламино-6-оксопурина с общими структурными формулами I-VI, изображенными на рис. 1. Эти соединения перспективны для разработки на их основе ингибиторов ТК.

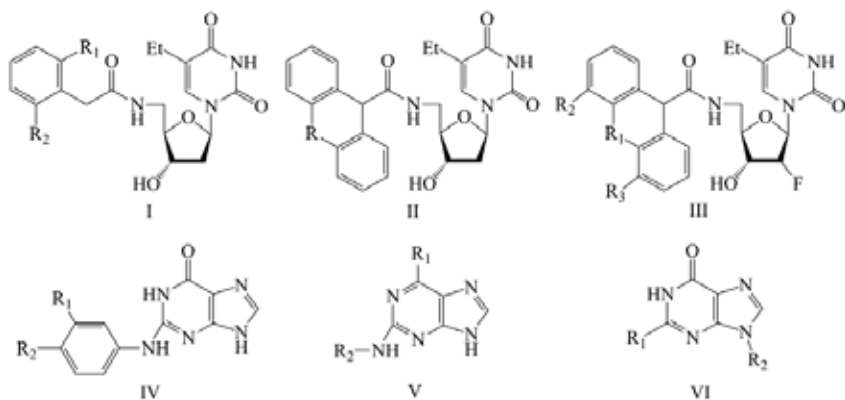


Рис. 1. Общие структурные формулы моделируемых ингибиторов ТК ВПГ-1 и ВПГ-2.

Методика эксперимента

Количественный анализ связи «структура-активность» для ингибиторов ТК ВПГ-1 и ВПГ-2 проводили с использованием компьютерной программы GUSAR 2013 (General Unrestricted Structure Activity Relationships) [5-6]. Построение моделей QSAR выполняли в несколько этапов по методике, подробно описанной в работах [7-8].

Обучающие (ОБ) и тестовые выборки (ТВ) для построения моделей QSAR формировали на основании литературных данных [2-4]. Обучающие выборки ОБ1 ОБ2 сформированы на основе данных

массивов МД1 и МД2. Обучающие выборки ОВ3 и ОВ4 получены в результате разбиения массива данных МД1 в соотношении 5:1. Для проверки предсказательной способности моделей М7 – М9 и М10 – М12 использовали тестовые выборки ТВ1 и ТВ2, соответственно.

Структуры соединений обучающих и тестовых выборок ОВ1 – ОВ4 и ТВ1 – ТВ2 создавали в программе MarvinSketch17.22.0 и с использованием программы DiscoveryStudioVisualiser переводили в SDF-формат.

Для построения моделей QSAR использовались данные IC_{50} в моль/л, которые затем были трансформированы в величины pIC_{50} по формуле:

$$pIC_{50} = -\log_{10}(IC_{50})$$

Модели QSAR строили на основе MNA и QNA-дескрипторов. Идеология их расчета приведена в работах [5-8]. Прогностическую способность моделей QSAR оценивали по результатам прогноза параметра IC_{50} для структур как обучающих, так и тестовых выборок.

Результаты и их обсуждение

С использованием консенсус-подхода, реализованного в программе GUSAR 2019 на основе MNA- и QNA-дескрипторов построено в общей сложности 8 моделей QSAR, ориентированных на прогноз pIC_{50} для ингибиторов ВПГ-1 и ВПГ-2. Эти консенсус-модели включают в себя в общей сложности 360 частных регрессионных уравнений. Все консенсус-модели QSAR применимы в диапазоне значений величины IC_{50} $0,09 \div 160000,0$ нмоль/л. Прогностическая способность QSAR М1-М8 оценена на структурах обучающих и тестовых выборок при скользящем контроле с 20-тикратным рандомизированным исключением 20% соединений. Статистические параметры этих моделей, а также характеристики точности предсказанных по ним значений pIC_{50} для ингибиторов ТК, входивших в обучающие и тестовые выборки, представлены в табл. 1.

Данные табл. 1 позволяют заключить, все построенные модели QSAR могут быть использованы для виртуального скрининга виртуальных библиотек и баз данных. Они позволяют прогнозировать численное значение IC_{50} (в нмоль/л) для потенциальных ингибиторов ТК ВПГ-1 и ВПГ-2 в диапазоне величины $\Delta pIC_{50} = 3-4$ единицы.

Таблица 1. Статистические характеристики и оценка показателей точности предсказаний значений pIC_{50} для ингибиторов ТК по моделям M1–M8.

OB	Мо- дель	N	R ² OB	R ² TB	F	S.D.	Q ² TB	V
QSAR-модели, построенные на основе QNA-дескрипторов								
OB1	M1	88	1,000	–	34,162	0,665	0,834	11
OB2	M4	89	1,000	–	47,877	0,679	0,857	10
OB3	M7	73	1,000	0,943	26,368	0,715	0,806	10
OB4	M10	74	1,000	0,803	53,301	0,688	0,853	7
QSAR-модели, построенные на основе MNA-дескрипторов								
OB1	M2	88	1,000	–	31,742	0,634	0,849	13
OB2	M5	89	1,000	–	37,416	0,643	0,872	14
OB3	M8	73	1,000	0,928	23,879	0,685	0,822	12
OB4	M11	74	1,000	0,885	42,461	0,677	0,858	9
QSAR-модели, построенные на основе QNA- и MNA-дескрипторов								
OB1	M3	88	1,000	–	32,300	0,635	0,849	13
OB2	M6	89	1,000	–	37,692	0,656	0,867	13
OB3	M9	73	1,000	0,948	25,233	0,690	0,819	11
OB4	M12	74	1,000	0,862	39,829	0,679	0,857	9

Примечание. N – число структур в обучающей выборке; R^2_{OB} – коэффициент детерминации, рассчитанный для соединений из обучающей выборки; R^2_{TB} – коэффициент детерминации, рассчитанный для соединений из тестовой выборки; Q^2 – коэффициент корреляции, рассчитанный на обучающей выборке при скользящем контроле с исключением по одному; F – критерий Фишера; S.D. стандартное отклонение, V – число переменных.

Как видно из данных табл. 1, численные значения коэффициентов детерминации R^2 и Q^2 для структур ингибиторов ТК ВПГ-1 и ВПГ-2, содержащихся во всех четырех обучающих выборках, довольно близки друг к другу; разность между этими двумя показателями ($\Delta = R^2 - Q^2$) не превышает величину 0,1. Эти данные свидетельствуют об устойчивости построенных консенсус-моделей.

В целом, анализ консенсус моделей QSAR, представленных в табл. 1, показал, что устойчивые регрессионные зависимости с приемлемыми статистическими характеристиками ($R^2 > 0,6$; $Q^2 > 0,5$) в программе

GUSAR могут быть построены как на одном определенном типе, так и на обоих типах дескрипторов (QNA или MNA).

Таким образом, подход используемый в программе GUSAR 2019, позволяет с высокой степенью надежности моделировать ингибиторной активностью в ряду 89 производных 5-этилуридина, N2-гуанина и 6-оксопурина в отношении ТК с целью разработки новых ингибиторов данного фермента.

Работа выполнена при поддержке гранта №19-73-20073 Российского научного фонда.

Список литературы

1. Tenser R.B. Role of herpes simplex virus thymidine kinase expression in viral pathogenesis and latency / Tenser R.B. // *Journal of Intervirology*. 1991. V. 32. –P. 76–92.

2. Martin J.A. Nucleoside analogues as highly potent and selective inhibitors of herpes simplex virus thymidine kinase / Martin J.A., Lambert R.W., Thomas G.J., Duncan I.D., Hall M.J., Merrett J.H. // *Journal of Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 2001. V. 11. P. 1655–1658.

3. Hildebrand C. Structure-activity relationships of N2-substituted guanines as inhibitors of HSV1 and HSV2 thymidine kinases / Hildebrand C., Sandoli D., Focher F., Gambino J., Ciarrocchi G., Spadari S., Wright G. // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1990. V. 33. P. 203–206.

4. Manikowski A. Inhibition of Herpes Simplex Virus Thymidine Kinases by 2-Phenylamino-6-oxopurines and Related Compounds: Structure-Activity Relationships and Antiherpetic Activity in Vivo / Manikowski A., Lossani A., Verri A., Gebhardt B.-M., Gambino J., Focher F., Spadari S., Wright G.E. // *Journal of Molecular Biochemistry*. 2006. V. 8. P. 3919-3929.

5. Хайруллина В.Р., Акбашева Ю.З., Янгирова К.Р., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г., QSAR-моделирование некоторых производных урацила с выраженной ингибиторной активностью в отношении дезоксиуридинфосфорилазы // *Вестник Башкирского университета*. 2018. Т.23. № 4. С. 987-993.

6. Хайруллина В.Р., Акбашева Ю.З., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г., Анализ взаимосвязи «структура-активность» в ряду некоторых производных 5-этилуридина с выраженной противогерпетической активностью // *Вестник Башкирского университета*. 2017. Т.22. № 4. С. 960-965.

7. Мартынова Ю.З., Хайруллина В.Р., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г., QSAR-моделирование ингибиторов дезоксиуридин-

трифосфатазы в ряду некоторых производных урацила // Биомедицинская химия. 2019. Т.65. №2. С. 103-113.

8. Martynova Y.Z., Khairullina V.R., Biglova Y.N., Mustafin A.G., Quantitative structure-property relationship modeling of the C60 fullerene derivatives as electron acceptors of polymer solar cells: Elucidating the functional groups critical for device performance // Journal of Molecular Graphics and Modelling. 2019. – V.88. P.49-61.

УДК 615.211.03:616-092.9].036.8

Петрачев А.С., Асташина Н.Б., Соснин Д.Ю.

ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А.Вагнера» Минздрава России,

Пермь

artempetrachev@tut.by

Разработка нового метода обезболивания мелких лабораторных животных

Установлено, что для безопасного и эффективного наркоза у крыс может использоваться лекарственный препарат телазол в дозе 25 мг/кг веса, обеспечивающий эффективное общее обезболивание, которое наступает через $6,02 \pm 1,03$ минут и длится $55,48 \pm 2,77$ минут.

Ключевые слова: лабораторные крысы, телазол, общее обезболивание.

Patrachev A.S., Astashina N.B. Sosnin D. Yu.

E.A.Vagner Perm State Medical University,

Perm

Development of a new method for anaesthetising small laboratory animals

It was found that for safe and effective anesthesia in rats, a drug can be used – telazol at a dose of 25 mg/kg of weight, providing effective General anesthesia, which occurs after 6.02 ± 1.03 minutes and lasts 55.48 ± 2.77 minutes.

Key words: laboratory rats, telazol, general anesthesia.

По-прежнему актуальной является разработка новых экспериментальных моделей различных заболеваний и патологических состояний, особенно с использованием мелких лабораторных животных (мыши, крысы) [2]. При этом важным вопросом является адекватное обезболивание при выполнении различных манипуляций на них. Используемые ветеринарами препараты не всегда могут обеспечивать

адекватное обезболивание у крыс и мышей. Требуется верификация дозы и особенности выбора обезболивающего препарата для каждого вида лабораторных животных [1].

Целью исследования являлась оценка эффективности общего обезболивания лабораторных крыс препаратом телазол®.

Материалы и методы. Для экспериментальной оценки возможного обезболивания в качестве модели были выбраны 40 беспородных белых крыс-самцов массой от 350 до 400 грамм. Крысы содержались в стандартных условиях вивария, с соблюдением всех норм по обращению с лабораторными животными, установленными международным сообществом и РФ [2].

Впервые выполнено моделирование наркоза путем внутримышечной инъекции препарата Телазол® (Zoetis Inc., США), представляющего собой комбинацию золазепам гидрохлорида с тилетамин гидрохлоридом в соотношении 1:1 (50 мг золазепам, 50 мг тилетамина), который обычно используется в ветеринарии для проведения общего обезболивания у кошек и собак. Рекомендуемая производителем дозировка препарата составляет 10,5-12,5 мг/кг массы тела для кошек, 10-13 мг/кг массы тела для собак при проведении небольших хирургических вмешательств, а максимально допустимая доза достигает 25 мг/кг массы тела для собак и 72 мг/кг массы тела для кошек. В инструкции к препарату отсутствовали указания по его дозировке для лабораторных крыс, являющихся частой экспериментальной моделью.

Глубину наркоза оценивали по наличию реакции на болевой раздражитель через 30 секунд – 1 минуту после внутримышечного введения лекарственного препарата.

При проведении общего обезболивания у лабораторных крыс, согласно рекомендациям производителя для небольших вмешательств у кошек и собак (10 мг/кг), выявлена неэффективность действия препарата, необходимая глубина медикаментозного сна отсутствовала. С целью уточнения дозировки препарата для крыс, проводилось постепенное увеличение введенной дозы путем дополнительных внутримышечных инъекций препарата из расчета 3 мг/кг массы тела каждые две минуты, до достижения необходимой глубины наркоза.

Эффективная глубина наркоза, обеспечившая возможность проведения хирургического вмешательства в полости рта, была достигнута при суммарной дозе лекарственного препарата 25 мг на 1 кг массы тела животного. Характеристики параметров, характеризующих глубину и длительность наркоза представлены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика общего обезболивания при использовании препарата «Телазол®» у белых крыс

	Вес животного (кг)	Масса препарата на кг веса животного (мг)	Достаточная глубина наркоза через (мин)	Продолжительность медикаментозного сна (мин)
Среднее значение (M) и его стандартное отклонение (SD)	0,44±0,05	25,83±4,11	6,02±1,03	55,48±2,77
Медиана (Me) и интерквартильный диапазон (25-75% перцентиль)	0,44 (0,41;0,47)	25,0 (23,0;28,1)	6,0 (5,0;7,0)	55,0 (54,0;56,0)
Минимальное и максимальное значение (min-max)	0,35-0,54	18,6-35,6	4,0-8,0	50,0-62,0

Данная дозировка была достигнута у всех 48 животных, вовлеченных в эксперимент, и доказала свою эффективность и достаточность, так как необходимая глубина медикаментозного сна достигалась через 5-7 минут после введения препарата и сохранялась до 1 часа. Затем, животные оставались вялыми и неактивными в течение еще 1-2 часов.

На сегодняшний день, проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных является широко востребованным. Особенно это актуально при хирургических операциях, когда требуется адекватная анестезия и аналгезия лабораторных животных. Использование ингаляционной анестезии является затруднительным, что обусловлено техническими сложностями и необходимостью применения специального оборудования для такого вида обезболивания [3]. Для адекватного обезболивания мелких лабораторных животных чаще стал применяться инъекционный наркоз, при котором для усиления аналгезии используются дополнительные лекарственные препараты [3, 4].

Использованный нами комбинированный препарат Телазол® (Zoetis inc., США) обеспечивает достаточную глубину наркоза у лабораторных крыс при однократном внутримышечном введении препарата в дозе 25 мг/кг веса животного. Эффективное обезболивание достигается через 6,02±1,03 минут и длится 55,48±2,77 минут.

Список литературы

1. Кадомцев Д.В., Пасечников Е.А., Голубев В.Г. Золетил-ксилазиновый наркоз в экспериментах у крыс // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований 2015 – № 5. С. 57-57.,
2. Красильщикова М.С., Семушина С.Г. Руководство по работе с лабораторными животными для сотрудников ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России, занятых проведением доклинических испытаний // М.: Изд-во ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова, 2015, 42с.
3. Фатеева Е.И., Чернов А.С., Телегин Г.Б. Общие принципы анестезии и анальгезии лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. 2014. № 2. С. 97-103.
4. Файн А.М., Петухова М.Н., Мигулёва И.Ю., Савотченко А.М. Сравнительная оценка двух схем внутримышечного наркозы у лабораторных крыс в эксперименте // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2019. Т. 22. № 2(69). С. 53-61.

УДК 615.322 + 543.422.3

Попихина М.М., Пузык М.В.
Российский государственный
педагогический университет им. А.И. Герцена
Санкт-Петербург
Mafunya7@mail.ru

Спектральные исследования водного экстракта *Hibiscus subdariffa*

*В статье представлены спектральные исследования водного экстракта пакетированного и листового *Hibiscus sabdariffa*, а также влияние на них водных растворов солей s- и p-металлов.*

Ключевые слова: *водный экстракт каркаде, спектры поглощения, влияние солей s- и p-металлов.*

Popikhina M.M., Puzyk M.V.
 Herzen University
 Saint Petersburg

Spectral research of *Hibiscus subdariffa* aqueous extract

*The article presents spectral studies of an aqueous extract of packaged and leaf *Hibiscus sabdariffa*, as well as the effect of aqueous solutions of s- and p-metal salts on them.*

Key words: *aqueous hibiscus extract, absorption spectra, the effect of s- and p-metal salts.*

Экстракты растений используются человечеством для лечебных и профилактических целей несколько тысячелетий. Чайной традиции в России более 300 лет, тогда как истории активного использования в нашей стране чая каркаде (гибискуса или суданской розы) – менее полувека [1]. Свежие и высушенные лепестки, чашечки и подчашки *Hibiscus sabdariffa* (далее Hs) используют для приготовления травяных горячих или холодных напитков, вин, джемов, желейных кондитерских изделий [2]. Но, и это важно – Hs востребован также и в медицине. В Китае, Индии, Мексике и некоторых африканских странах экстракт каркаде используется для лечения заболеваний сердца, печени, высокого кровяного давления, для стимулирования перистальтики кишечника, как мочегонное, желчегонное, жаропонижающее средство. Также установлено [3] его антибактериальное действие против *Streptococcus mutans* – бактерий, вызывающих кариесное поражение органов ротовой полости. В [4] изучена антиоксидантная активность чая каркаде, обусловленная сильным поглощающим действием активных форм кислорода, свободных радикалов, ингибированием активности ксантиоксидазы.

Род *Hibiscus* включает в себя более 300 видов однолетних или многолетних трав, кустарников или деревьев [5]. Основными составляющими Hs, имеющим фармакологическое значение, являются органические кислоты, антоцианы, полисахариды и флавоноиды. Массовая доля кислот в гибисфлорах варьируется: гибискусная кислота – 13-24%, лимонная – 12-20%, яблочная – 2-9%, винная – 6-8%, аскорбиновая – 0,02-0,05% [6]. Флавоноиды в отличие от фенольных антиоксидантов (например, токоферолов) кроме прямого антирадикального действия способны связывать катионы переходных металлов, образуя хелатные комплексы. Такого рода координационные соединения приводят к ингибированию свободнорадикальных процессов, причем металлокомплексы ряда флавоноидов являются более эффективными перехватчиками анион-радикала кислорода, чем исходные комплексы [7]. Согласно [8], флавоноиды ингибируют моноаминоксидазу, предотвращая окислительное дезаминирование катехоламинов, и тем самым подавляют продукцию активных форм кислорода, что весьма перспективно для лечения некоторых нейродегенеративных заболеваний.

Антоцианы – это группа производных флавоноидов и природных пигментов, присутствующих в засушенных цветках Hs, изменяющих свой цвет в зависимости от pH раствора. Кислые растворы окрашены в красный цвет. При уменьшении концентрации катионов водорода изменяются и цвет и интенсивность окраски: при pH=8 раствор –

фиолетовый, а при $pH=11$ – синий. Эти изменения авторы [9] объясняют происходящими в молекулах антоцианов структурными изменениями хромонилиевого цикла.

Из цветков гибискуса были выделены четыре различных антоциана (рис.1): гибисцин (дельфинидин-3-самбубиозид), дельфинидин-3-глюкозид, хризантенин (цианидин-глюкозид) и госсипицианин (цианидин-3-самбубиозид) [10]. Массовая доля антоцианов зависит от многих факторов (генетики, климата, погоды, урожайности и т.д.) и находится в пределах 1.5-2.5%. Согласно [11] за антиоксидантную активность чая каркаде отвечают дельфинидин-3-глюкозид (класс полифенолов) и протокатеховая кислота.

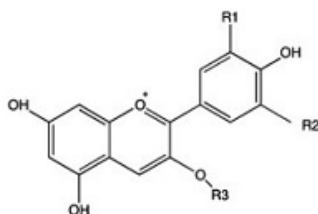


Рис. 1. Структурные особенности антоцианов каркаде: цианидин-самбубиозид ($R1=OH$, $R2=H$, $R3=$ самбубиозид), дельфинидин-3-самбубиозид ($R1=OH$, $R2=OH$, $R3=$ самбубиозид), цианидин-3-глюкозид ($R1=OH$, $R2=H$, $R3=$ глюкозид), дельфинидин-3-глюкозид ($R1=OH$, $R2=OH$, $R3=$ глюкозид)

В работе [12] оценивалась не количество антиоксидантов, а непосредственно природа антиоксидантного и мембранопротекторного действия водных экстрактов черного, зеленого чая и чая каркаде на клетки организма. Было установлено, что резистентность эритроцитов к перекисному гемолизу повышалась под влиянием зеленого чая на 25%, черного чая – на 78% и снижалась под влиянием каркаде на 16%. Однако, при гипореактивности фагоцитов *in vitro* под влиянием черного чая функциональный резерв клеточной резистентности резко снижался, под влиянием зеленого чая – не изменялся, а под влиянием каркаде наблюдалась тенденция к нормализации.

Таким образом, растительное сырье *Hs* представляет собой перспективный объект для исследований, который проявляет антиоксидантную и антибактериальную активность, и является натуральным красителем и pH -индикатором. В данной работе, расширяющей области исследования, представлены: спектральный сравнительный

анализ водного экстракта каркаде (далее ВЭК), приготовленного из пакетированного и листового каркаде (оба типа чая «Принцесса Ява» ООО «Орими»), а также исследование влияния водных растворов солей s- и p-металлов на спектральные свойства чая каркаде.

Экспериментальная часть

ВЭК готовили из расчета 2 г чая (эту массу пишет, но не всегда выдерживает производитель чая в пакетиках) на 200 мл горячей дистиллированной воды (90°C), настаивали 20 минут, в течение которых чай остывал до комнатной температуры. Листовой чай каркаде предварительно измельчали в ступке. Поскольку после декантации растительное сырье оставалось окрашенным, тем же способом проводили вторую и третью экстракции. Для корректного снятия спектров поглощения первичный экстракт разбавляли в 2 раза, растворы второй и третьей экстракции брали неизменными. Спектры поглощения получали на фотоколориметре КФК-2МП в стеклянных кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Для исследования влияния катионов s- и p-металлов на спектральные характеристики ВЭК были приготовлены серии водных растворов солей (сульфата алюминия; нитрата свинца; хлоридов калия, натрия, магния, кальция, стронция и бария) с концентрацией 20 ммоль/л. Все исследуемые растворы были объемом 6 мл. Первый раствор состоял из 2 мл ВЭК и 4 мл воды, а в последующих растворах доля воды заменялась раствором соответствующей соли с шагом 1 мл. Данные соли выбраны потому, что их водные растворы бесцветны в видимом диапазоне, в отличие от чая каркаде. Влияние растворов солей d-металлов планируется изучать в следующем году.

Результаты и их обсуждение. В первой части исследования получены и проанализированы спектры поглощения ВЭК листового и пакетированного типов. На рисунке 2 представлены спектры поглощения пакетированного и листового ВЭК: верхняя пара спектров соответствует первой экстракции, средняя – второй, а нижняя – третьей. Все спектры поглощения вне зависимости от происхождения сырья (пакетированное или листовое) имеют четкую полосу поглощения при 492 нм. Используя закон Бугера-Ламберта-Бэра, приняв во внимание информацию о массовой доле антоцианов 1.5-2.5% [11], а также усредненное значение молярной массы антоцианов (~450 г/моль) [10], была получена оценка коэффициента молярного поглощения ~7000 л/(моль×см), которая соответствует π-π* переходам в ароматической системе [13] (в нашем случае антоцианов).

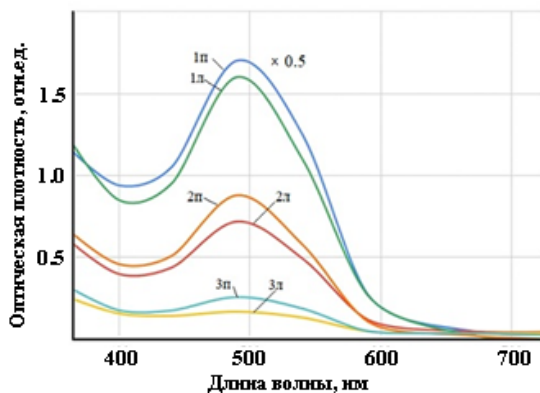


Рис. 2. Спектры поглощения первой (1), второй (2) и третьей (3) экстракции пакетированного (п) и листового (л) каркаде. Растворы первой экстракции разбавлены в 2 раза

На рис. 3 представлены диаграммы нормированных по максимуму спектров поглощения (492 нм) для пакетированного и листового образцов, из которых четко видно, что спектр поглощения второй экстракции редко превышает 25%, а спектр поглощения третьей экстракции – не более 8%. Спектральные характеристики ВЭК при комнатной температуре не меняются в течение 4 суток, после чего наблюдалось образование плесени. Совокупность полученные данных указывает на идентичность сырья и на устойчивость сопряженной

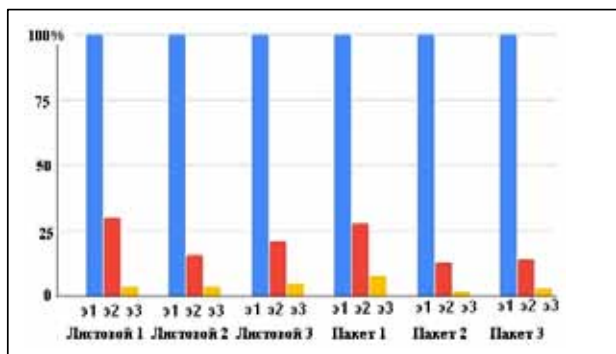


Рис. 3. Нормированные спектральные данные листового и пакетированного водных экстрактов каркаде (э1 – первая, э2 – вторая, э3 – третья экстракция)

системы хромофоров каркаде в водных растворах при действии молекулярного кислорода воздуха.

Вторая часть работы состояла в исследовании влияния катионов s- и p-металлов на спектральные свойства ВЭК. Нами установлено, что растворы солей s- металлов (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+}) не изменяют спектральные характеристики ВЭК. Влияние анионов (хлорид-, сульфат- и нитрат-ионов) солей на спектральные свойства не изучалось, и заведомо были исключены анионы, подвергающиеся гидролизу (карбонат-, ортофосфат- и ацетат-ионы). Растворы сульфата алюминия и нитрата свинца (II) приводили к посинению раствора: гипер- и батохромному смещению спектров поглощения на 20 нм (рис.4).

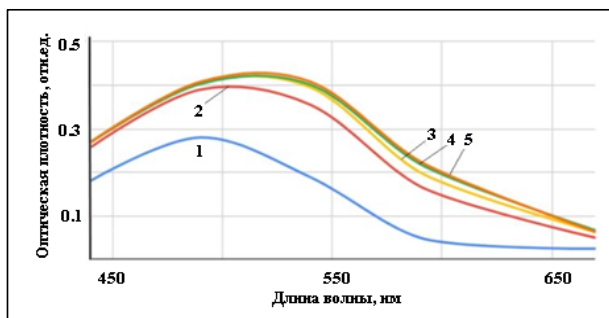


Рис. 4. Спектральные изменения ВЭК при добавлении раствора $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$: 1-0 мл, 2-1 мл, 3-2 мл, 4-3 мл, 5-4 мл

Причина эффективного взаимодействия гидролизующихся катионов алюминия и свинца (II) состоит в повышенном поляризующем действии катионов p-металлов, в более прочных комплексах с хелатирующими антоцианами Hs (по сравнению с исходными аквакомплексами). Для хлорида алюминия подобное исследование [14] известно в этаноле. Авторы наблюдали еще больший батохромный сдвиг, обусловленный сольватохромизмом.

И хотя соли алюминия относятся к малотоксичным веществам, в отличие от высокотоксичных и канцерогенных солей свинца (II), у данного исследования может быть биохимическое продолжение, связанное с установлением активности в организме комплекса «катион p-металла-антоциан» (на примере катионов алюминия и свинца (II)). Это исследование является также актуальным в условиях рыночной экономики, когда недобросовестный изготовитель может ввести в заблуждение малоинформированного потребителя, либо когда гражданин в силу удаленности от цивилизации потребляет воду для питья низкого качества.

Таким образом, в работе спектрально продемонстрирована равноценность листового и пакетированного чая каркаде, а с точки зрения потребителя – разрушен миф о их различии. А также установлено эффективное связывание катионов алюминия и свинца (II) антоцианами каркаде.

Список литературы

1. Чай./ Сост. А.В. Савельевских. Екатеринбург: У-Фактория, 2005. с.192.
2. M.K. Bolade, I.B. Oluwalana, O. Ojo Commercial practice of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage production: Optimization of hot water extraction and sweetness level // *World Journal of Agricultural Sciences*. 2009. №.5. P. 126-131.
3. I. Da-Costa-Rocha, B. Bonnlaender, H. Sievers, I. Pischel, M. Heinrich *Hibiscus sabdariffa* L. a phytochemical and pharmacological review // *Food chemistry*. 2014. № 165. P. 424-443.
4. E.O. Farombi, A. Fakoya Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. // *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005. № 49 (12). P. 1120-1128.
5. M.L. Wang, B. Morris, B. Tonnis, J. Davis, G.A. Pederson Assessment of oil content and fatty acid composition variability in two economically important *Hibiscus* species // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012. № 60 (26). P. 620-662.
6. H. Eggenesperger, M. Wilker *Hibiscus-Extrakt – Ein hautvertraglicher Wirkstoffkomplex aus ANA'a und polysacchariden* // *Parfumerie und Kosmetik*. 1996. № 9. P. 540-543.
7. Писарев Д. И., Новиков О. О., Селютин О. А., Писарева Н. А. Биологическая активность полифенолов растительного происхождения. Перспектива использования антоцианов в медицинской практике // *Научн. ведомости БелГУ. Сер.: Медицина. Фармация*. 2012. № 10.
8. O. Inanami, Y. Watanabe, B. Syuto, M. Narano, M. Tsuji, M. Kuwabara Oral administration of (-) catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil // *Free radical research*. 1998. № 29 (4), P. 359-365
9. Харламова О.А., Кафка Б.В. *Натуральные пищевые красители*. М.: Пищ. пром, 1979. 191 с.
10. Болотов В.М. Модифицированные пищевые красители растительного сырья: получение, состав, свойства и области применения: дис. ... докт. техн. 03.00.23, 2000. 380с.

11. A. Degenhardt, H. Knapp, P. Winterhalter Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000. № 48 (2). P. 338-343.

12. Лесовская М.И. Оценка мембранопротекторной и антиоксидантной активности различных сортов чая // Фундаментальные исследования. 2015. № 2-4. С. 727-733.

13. Беккер Г.О. Введение в фотохимию органических соединений. Ленинград: Химия. 1976. с. 384.

14. Аверьянова Е.В., Школьников М.Н., Егорова Е.Ю. Физиологически активные вещества растительного сырья: учебное пособие. Бийск: Изд-во Алтайского гос. техн. университета, 2010. с.105.

УДК 547.541.124

*Попов А.С., Иванова И.С.
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова
Минздрава России, Санкт-Петербург
popovas1965@mail.ru*

**Характеристики эффективности флотационной очистки
промышленных вод, содержащих масло-жировые
и белковые загрязнения**

Решение экологических проблем, связанных с очисткой сточных вод различных пищевых производств, требует совершенствования как процессов, так и показателей очистки воды, измеряемых автоматически. В настоящей работе получены количественные показатели процесса очистки сточных вод методом флотации с применением современных реагентов, для разработки компьютеризированных систем регулирования и контроля технологических процессов.

Ключевые слова: *очистка сточных вод, масло-жировые и белковые компоненты, флотация, взвешенные частицы, флотационные реагенты, показатели очистки.*

*Popov A.S., Ivanova I.S.
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
Russia, St.-Petersburg*

**Characteristics of flotation method effectivity in the purification process
of industrial water, contained of the fats and proteins impurities**

Solution of ecological problems, which are connected with purification of industrial water, demands the investigation both of purification methods

themselves, using a new chemical reagents, and characteristics of the purification water process, which can be automatic measured. Presented investigation is corresponded to construction of the digital systems to regulate and control of the technological processes and they result in increasing of the safety and economical effectivity for water-purification equipment. In the given report quantity data have been obtained for the water purification using flotation on the bases of the new chemical reagents

Key words: *water purification, flotation, fat and protein impurities, coagulation reagents, suspended species, purification characteristics.*

Объектом исследования являются сточные воды мясоперерабатывающего производства. Характеристики загрязнений: взвешенные частицы (суспендированные и эмульгированные) от 500 до 300 г/м³, рН 5 – 8, ХПК (химическое потребление кислорода) от 500 до 4000 мгО₂/л, БПК₅ (биологическое потребление кислорода) 500 – 2500 мгО₂/л, содержание жира 500 – 5000 г/м³, аммонийный азот 0,7 – 1,1 г/м³, сульфаты 25 – 45 г/м³, хлориды 150 – 300 г/м³, железосодержащие компоненты 0,5 – 2,5 г/м³, сухой остаток 0,07 – 0,1%. Большое значение для разработки эффективных методов очистки сточных вод имеют детальные характеристики загрязнений, особенно их средние значения, которые представлены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристики загрязнений сточных вод масло-жирового производства

Наименование загрязняющих веществ	Концентрация, г/м ³		
	Среднее значение	Минимальное	Максимальное
Взвешенные вещества	1400	500	3000
Жир	2400	500	5000
Аммоний катион	0,95	0,7	1,1
Сульфаты	35	25	45
Хлориды	200	150	300
Железосодержащие компоненты	1,4	0,5	2,5
Сухое вещество, %	0,09	0,07	0,1

В настоящей работе в качестве технологичного и высокоэффективного метода водоочистки выбран метод флотации с применением современного реагента «Ferrix 3, Kemira» [1]. Это позволит предложить промышленности не только усовершенствованные технологии

водоочистки, но и физико-химические показатели контроля технологических процессов, что необходимо для создания компьютеризированных систем автоматического регулирования. В настоящем исследовании использованы нормативные требования, предъявляемые к очищенным производственным водам, основные показатели которых представлены в табл.2 и 3.

Таблица 2. Требования, предъявляемые к очищенным производственным водам

Характеристика	Концентрация, г/м ³
Взвешенные вещества	100
Жир	50
рН	7-9
БПК5, мг O ₂ /л	700

Таблица 3. Установленные нормативы на воды, сбрасываемые в городской сточный коллектор [2]

Наименование загрязняющих веществ	Нормативы загрязняющих веществ в сточных водах прочих абонентов бассейнов канализования общесплавных или бытовых выпусков, г/м ³
Взвешенные вещества	300
Жир	1,1
Аммоний катион	18
Сульфаты	500
Хлориды	1000
Железосодержащие компоненты	1,1

Флотацией называют метод разделения суспендированных частиц и выделения капель дисперсной фазы из эмульсий. Флотация основана на различной смачиваемости частиц и капель жидкостью (водой) и на их избирательной адгезии к поверхности раздела вода-воздух. Метод использует специальные флотационные реагенты – чаще всего поверхностно-активные вещества, собиратели (коллекторы), пенообразователи и модификаторы. Флотация, в зависимости от происходящих физико-химических процессов, может быть пенной сепарацией, вакуумной, флотогравитационной, ионной, электрофлотационной, масляной и пленочной. Применительно к исследуемому объекту (сточной воде пищевого производства) найдено, что для целей очист-

ки оптимальной является пенная сепарация. В этом методе флотация осуществляется в трехфазной системе: загрязняющие частицы – жидкость – газ. Загрязняющие частицы – это суспендированные и эмульгированные твердоподобные частицы масло-жировой и белковой природы. Жидкая фаза содержит воду и частицы коллоидного размера. Газовая фаза состоит из пузырьков воздуха размером от мкм до 1 – 2 мм, которые образуются при подаче воздуха через диспергационное устройство – аэратор. При сближении в водной среде пузырька газа и гидрофобной частицы загрязнения, адгезия которой к воде меньше когезии воды, разделяющая их водная пленка самопроизвольно разрывается. Этот этап флотации заканчивается полным смачиванием частицы и прочным слипанием с пузырьком газа. В дальнейшем ассоциаты частица загрязнения – пузырек воздуха всплывают вследствие меньшей плотности на поверхность пульпы и удаляются флотационной машиной.

В работе в качестве процесса водоочистки исследована технология, которая состоит из трех последовательных стадий. Первая стадия – это тонкая механическая очистка посредством фильтрации. Далее – ступень безреагентной флотационной очистки посредством удаление всплывающих из пульпы масс без применения химических веществ. Третья стадия – это физико-химическая флотационная очистка с применением коагулянта и флокулянта. Коагулянт – это вещество, способствующее слипанию и укрупнению загрязняющих частиц. Коагуляция осуществляется в коагуляционной емкости, в которой происходят физико-химические изменения сточных вод, осветленных на первых двух стадиях технологии водоочистки. В качестве коагулянта исследован реагент «Fertix 3, Kemira». Изучено влияние различных концентраций названного коагулянта (от 5 до 25 % в водном растворе) на эффективность флотационной очистки и pH.

Для глубокой и всесторонней оценки качества и эффективности предлагаемого метода очистки сточных вод использованы следующие экспериментально-определяемые количественные показатели. Мутность – определялась с использованием стандартных методик фотокolorиметрическим методом на приборе МКМФ-1 с длиной волны анализатора 425 нм и толщиной слоя анализируемого раствора 0,01 м. Содержание суспендированных частиц изучалось на фильтре обеззоленном (ТУ 6-09-1678-86 с массой золы 1 фильтра 0,00015г). 50 мл жидкости фильтровалось через указанный фильтр, который потом подвергался полному обезвоживанию в токе воздуха комнатной температуры в течении 24 часов и взвешивался. Точность взвешивания самого фильтра и фильтра с суспендированными частицами состав-

ляет 0,0005 г. Общее содержание растворенных веществ определялось методом сухого остатка при полном выпаривании 10 мл жидкости в токе воздуха. Активная кислотность (ммоль/л) вычислялась по значению водородного показателя рН, который определялся на приборе Sartorius professional meter PP-50 с точностью до 0,01 единицы рН. Общая кислотность (ммоль/л) измерялась физико-химическим методом путем титрования раствором щелочи с концентрацией 0,01Н по показаниям рН. Потенциальная кислотность (ммоль/л) рассчитывалась как разность между активной и общей кислотностью. Химическое потребление кислорода (ХПК), которое характеризует содержание всех органических веществ, растворенных в жидкости, в том числе трудноокисляемых жиров и белков, проводилось по следующей методике. 50 мл исследуемой жидкости нагревали в присутствии бихромата калия (0,1Н) и серной кислоты при рН=0 в течение 1 час. После нагревания анализируемый раствор оттитровывали по методике обратного иодиметрического титрования с использованием 0,1Н иодида калия и 0,1Н тиосульфата натрия. Биохимическое потребление кислорода (БПК) характеризует изменение концентрации кислорода, растворенного в анализируемой жидкости, с течением времени и дает информацию о содержании в воде биологически разлагаемых веществ и легко окисляемой органике. В работе определялся показатель БПК₅, для этого в момент отбора пробы определялся растворенный кислород, затем проба хранилась в темноте в течение 5 суток и содержание кислорода определялось повторно. Параметр БПК₅ рассчитывался как разность содержания кислорода до и после хранения. Само содержание кислорода, растворенного в воде, проводилось по стандартной методике, основанной на обменной реакции получения $Mn(OH)_2$, который при взаимодействии с растворенным кислородом количественно окисляется до четырехвалентного марганца. В свою очередь концентрация четырехвалентного марганца определялась методом прямого иодометрического титрования с использованием титранта иода 0,01Н.

Все указанные выше показатели воды использовались для контроля протекающих технологических процессов на конечных этапах водоочистки. В технологические процессы очистки вносились такие изменения, которые приводили к систематическому и достоверному улучшению показателей воды для различных начальных условий. Установлено, что наибольшую сложность в процессе очистки сточной воды от загрязнений, моделирующих масло-жировое и мясное производство, представляет коагуляция масло-жировых примесей. Масло-жировые примеси образуют в воде эмульсии, классифицируемые как «масло в воде». Вследствие гидрофобного характера дисперсной

фазы применение различных процессов флотации оказывается менее эффективным, чем для очистки от загрязнений белковой природы. В настоящей работе установлено, что особую трудность для очистки от масло-жировых эмульсий представляет тот факт, что белки выполняют роль собственно эмульгаторов и противодействуют коагуляции жиров под действием реагентов [3]. Белки значительно повышают агрегативную устойчивость эмульсий вследствие специфической адсорбции на границе вода-жир [4]. Для количественного описания такой специфической адсорбции белков были выполнены исследования по добавкам анионогенных ПАВ в очищаемую воду. ПАВ способны десорбировать белки с границы вода-жир и облегчить водоочистку в итоге. Но полученные количественные результаты оказались нелнейными, что говорит о более сложном характере адсорбции белков, следовательно можно утверждать, что в очищаемых образцах сточных вод имеются или эффекты хемосорбции пептидов на гидрофобной поверхности, или дополнительные примеси, не учтенные в исходных данных.

Результаты исследования. В результате проведенных исследований удалось достичь показателей очищенных сточных вод, которые соответствуют требованиям, предъявляемым к водам, сбрасываемым в городской сточный коллектор: взвешенные частицы 100 г/м^3 , рН 7 – 8, БПК₅ $700 \text{ мгО}_2/\text{л}$, содержание жира 50 г/м^3 , аммонийный азот $0,17 \text{ г/м}^3$, сульфаты 45 г/м^3 , хлориды 100 г/м^3 .

Экспериментально найдено, что зависимость дозы коагулянта от процентной концентрации взвешенных частиц, является параболической и имеет минимум, который соответствует параметрам флотационного процесса, обеспечивающим наилучшую очистку воды.

В качестве параметров флотационного процесса, которые могут измеряться автоматически, не требуют присутствия человека и напрямую определяют эффективность водоочистки, предложены: расход сточных вод, расход раствора коагулянта, расход раствора щелочи (для стабилизации рН), значение рН и кондуктометрическое измерение концентрации загрязняющих частиц в очищенной воде.

Список литературы

1. Гетманцев С.В., Нечаев И.А., Гандурина Л.В. Очистка производственных сточных вод коагулянтами и флокулянтами. М., Из-во АСВ, 2008г., 272 с.
2. «Условия приема загрязняющих веществ в сточных водах, отводимых абонентами в системы канализации Санкт-Петербурга», к приказу Комитета Администрации Санкт-Петербурга от 25.11.1996г.

№ 201 в редакции распоряжения Комитета по энергетике и инженерному обеспечению от 26.08.2005 № 60. 10 с.

3. G. G. Roberts, Potential Applications of Langmuir-Blodgett Films, Langmuir-Blodgett Films (2013) 317–411. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3716-2_7

4. Yanklovich M.A., Ivanov N.S., Sukhodolov N.G., Zhukov A.N., A study of the properties and composition of stearic acid monolayers on an aqueous subphase containing cadmium ions, Colloid Journal, 78(2) (2016) 277–280. DOI: 10.7868/S0023291216020166

УДК 577.112.5:547.96

Рейпольская Т.Ю., Субботина Т.Ф.
ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова
Санкт-Петербург
23091991tink@mail.ru, subbotina2002@mail.ru

Моделирование *in silico* взаимодействия митохондриальных хуманиноподобных пептидов с ионами двухвалентных металлов

*Работа посвящена определению возможности связывания хуманина и его аналогов с ионами двухвалентных металлов для последующего изучения транспортных и регуляторных механизмов, обуславливающих цитопротекторное и антиапоптотическое действие данного пептида с применением современных методов компьютерного моделирования *in silico*.*

Ключевые слова: хуманин, митохондриогенез, моделирование *in silico*, нейтропротективное действие.

Reypol'skaya T. Yu., Subbotina T. F.
Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
Saint Petersburg

In silico modeling of interaction of mitochondrial humanine-like peptides with bivalent metal ions

*The work is devoted to the determination of the possibility of binding of humanin and its analogs to bivalent metal ions for the subsequent study of transport and regulatory mechanisms determining the cytoprotective and antiapoptotic effects of this peptide using modern methods of computer modeling *in silico*.*

Key words: *humanin, mitochondriogenesis, in silico modeling, neuroprotective effect.*

Введение. Митохондрии выполняют множество важных функций, помимо регуляции энергетического обмена, что оказывает влияние на большинство областей клеточной биологии и медицины [1]. В качестве составной части клетки, митохондрии играют ключевую роль в регуляции сигнальных путей, пролиферации клеток, гибели клеток и клеточной дифференцировки [2]. Исследование свойств, механизма действия и функциональной роли митохондриальных пептидов играет важную роль в изучении патогенеза заболеваний, связанных с нарушением окислительного метаболизма тканей из-за наличия митохондриальной дисфункции [3]. Хуманин, как биологически активный микропептид, кодируемый в митохондриальном геноме рибосомальной РНК 16S, T-MRNR2, был первоначально идентифицирован в 2001 году группой ученых Хашимото и др. из выживших нейронов у пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) [4]. Были обнаружены две формы хуманина с разными аминокислотными последовательностями: цитоплазматическая форма представляет собой пептид из 24 аминокислот и соответствует последовательности MAPRGFSCLLLLTSEIDLPKRRA [5,6], тогда как митохондриальная форма представляет собой пептид из 21 аминокислоты MAPRGFSCLLLLTSEIDLPKV [7]; по структуре обе формы хуманина содержат трёхоборотную α -спираль и не имеют симметрии [8]. Известны несколько форм хуманина с единичными аминокислотными заменами [6,8].

Материалы и методы. Первичные последовательности исходного (HN) и модифицированного S14G (HNG) хуманина были взяты из базы UniProt. Первоначально их трехмерные модели были построены и количественно охарактеризованы с помощью алгоритма I-TASSER, входящего в группу программ компьютерного моделирования белковых молекул *in silico* [9]. I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement) представляет собой интегрированную платформу для автоматического предсказания структуры и функций белка на основе парадигмы последовательность-структура-функция [10]. Начиная с аминокислотной последовательности, I-TASSER сначала генерирует трехмерные атомарные модели из многопоточных выравниваний и итерационных структурных сборок. Затем функция белка определяется структурным сопоставлением трехмерных моделей с другими известными белками [11]. Выходные данные, полученные за один цикл расчетов, содержат полноразмерные прогнозы вторичной и третич-

ной структуры, а также функциональные аннотации на сайтах связывания лигандов. Оценка точности прогнозов предоставляется на основе достоверной вероятности моделирования. В работе также использовался метод прогнозирования сайтов связывания для ионов металлов MIB (Metal Ion-Binding site prediction and docking server), – точный, интегрированный метод поиска сайтов связывания ионов металлов с использованием алгоритма преобразования фрагментов [12,13], и программа IonCom – лиганд-специфический метод прогнозирования малых участков связывания лигандов, включая ионы металлов и различных кислотных остатков [14].

Результаты. При помощи алгоритма I-TASSER для каждой из форм хуманина были отобраны и охарактеризованы по три наиболее устойчивых конформации, были измерены структурные характеристики трех возможных конформаций двух форм хуманина. В результате проведения нескольких циклов расчетов было показано, что HNG может образовывать соединения с цинком, магнием и кальцием, в то время как HN связывается только с магнием, при этом сайты связывания лигандов остаются неизменными, – это 15 и 17 аминокислотные остатки (АО) – рис. 1. Оценка величин вероятностного фактора связывания C-score для HNG показала, что эта величина в случае связывания цинка больше, чем в случае связывания магния – 0,19 и 0,17, соответственно, при шкале [0;1]. При помощи метода MIB были получены данные, свидетельствующие о возможности образования соединений HN с медью (4,8 АО) и марганцем (14, 15 АО), цинком (8,9 АО). В программе IonCom был произведен расчет, в результате которого было показано, что HN может образовывать комплексы с железом и кальцием (14, 16, 17, 18 АО), в то время как HNG может образовывать комплексы с цинком (4, 8, 15, 16, 17, 18 АО), марганцем (8,9 АО) и кальцием (6, 8, 9, 15, 17 АО).

Обсуждение. Известно, что некоторые белки и пептиды в физиологических условиях существуют в виде комплексов с определёнными ионами, которые не только способствуют стабилизации окончательной трехмерной белковой структуры, но и придают им специфическое средство к рецепторам. Цинк – один из самых значимых микроэлементов, задействованных в важнейших процессах жизнедеятельности организма: он входит в состав многих ферментов, участвует в каталитических, обменных и структурных функциях, регуляторной функции на уровне в т.ч. внутри- и межнейронных взаимодействий; ещё одна группа функций цинка обозначается как генетически транскрипционная, развёртывающаяся в экспрессии генов. Особого внимания заслуживают результаты исследования, свидетельствующие о

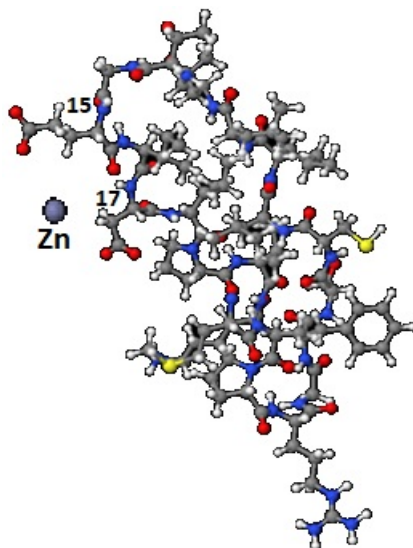


Рис. 1. Комплекс цинка с HNG

роли цинка в деятельности нейрона, не только в регуляции возбуждения и торможения, но и в обеспечении ряда тонких мембранных процессов нервной клетки, а также изучение функциональной связи цинка с медиаторными системами мозга и с глутаматэргической системой [15]. Выявлен необычный факт многократного возрастания нейропротекторной активности за счет единственного АО с заменой S14G в молекуле хуманина [16]. В результате нашего модельного эксперимента можно сформулировать предположение, что это может быть связано в т.ч. со способностью HNG образовывать соединения с цинком и тем самым стабилизировать структуру этого пептида в физиологических условиях. По данным литературы это сопоставляется с наблюдением, описанным в работе [17], в которой исследовано влияние pH среды и температуры на устойчивость разных форм хуманина в растворе. Авторы этой работы показали, что стабильность структуры при 37°C увеличивается в порядке S7A-HN, HN и HNG в корреляции с их нейрозащитной активностью. Пептид хуманин, экспрессируемый внутриклеточно или добавляемый внеклеточно, защищает нейронные клетки от Abeta-индуцированной гибели клеток, препятствуя отложению фибрилл и аморфных агрегатов путём подавления окислительного стресса и апоптоза, что было показано

в исследовании [18], посвященном изучению процесса амилоидобразования Аβ пептида. Патологическое накопление пептида бета-амилоида в форме сенильных (или амилоидных) бляшек является одним из признаков нейродегенеративных расстройств [4,18].

Выводы. Митохондриальные хуманиноподобные пептиды могут дать новое понимание изучения патофизиологии нейродегенеративных расстройств и открыть новые пути для разработки терапевтических вмешательств. Усиление нейропротекторных свойств HNG по сравнению с HN может быть связано с его способностью образовывать соединения с цинком, что, безусловно, нуждается в экспериментальной проверке. Способность связывания HNG с цинком имеет предположительно электростатический характер с задействованием двух карбоксильных групп остатков глутамата и аспартата. Другим фактором, оказывающим влияние на данное взаимодействие, может быть стерический эффект.

References

1. Picard M, Wallace DC, Burelle Y. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*. 2016 Sep;30:105-16. doi: 10.1016/j.mito.2016.07.003
2. Kabekkodu SP, Chakrabarty S, Shukla V, Varghese VK, Singh KK, Thangaraj K, Satyamoorthy K. Mitochondrial biology: From molecules to diseases. *Mitochondrion*. 2015 Sep;24:93-8. doi: 10.1016/j.mito.2015.07.008
3. Viscomi C, Bottani E, Zeviani M. Emerging concepts in the therapy of mitochondrial disease. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1847(6-7):544-557. doi:10.1016/j.bbabi.2015.03.00
4. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M, Sobue G, Koide T, Tsuji S, Lang J, Kurokawa K, Nishimoto I. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Aβ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 22;98(11):6336-41. doi: 10.1073/pnas.101133498
5. Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E, Abe Y, Kita Y, Nishimoto I. Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci*. 2001 Dec 1;21(23):9235-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-23-09235.2001
6. Yamagishi Y, Hashimoto Y, Niikura T, Nishimoto I. Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-relevant insults. *Peptides*. 2003 Apr;24(4):585-95. doi: 10.1016/s0196-9781(03)00106-2

7. Maximov V, Martynenko A, Hunsmann G, Tarantul V. Mitochondrial 16S rRNA gene encodes a functional peptide, a potential drug for Alzheimer's disease and target for cancer therapy. *Med Hypotheses*. 2002 Dec;59(6):670-3. doi: 10.1016/s0306-9877(02)00223-2
8. Benaki D, Zikos C, Evangelou A, Livaniou E, Vlasi M, Mikros E, Pelecanou M. Solution structure of humanin, a peptide against Alzheimer's disease-related neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Apr 1;329(1):152-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.100
9. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*. 2010 Apr;5(4):725-38. doi: 10.1038/nprot.2010.5
10. Roy A, Yang J, Zhang Y. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jul;40(Web Server issue):W471-7. doi: 10.1093/nar/gks372
11. Zhang C, Freddolino PL, Zhang Y. COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jul 3;45(W1):W291-W299. doi: 10.1093/nar/gkx366
12. Lu CH, Lin YF, Lin JJ, Yu CS. Prediction of metal ion-binding sites in proteins using the fragment transformation method. *PLoS One*. 2012;7(6):e39252. doi: 10.1371/journal.pone.0039252
13. Lin YF, Cheng CW, Shih CS, Hwang JK, Yu CS, Lu CH. MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server. *J Chem Inf Model*. 2016 Dec 27;56(12):2287-2291. doi: 10.1021/acs.jcim.6b00407
14. Hu X, Dong Q, Yang J, Zhang Y. Recognizing metal and acid radical ion-binding sites by integrating ab initio modeling with template-based transfers. *Bioinformatics*. 2016 Nov 1;32(21):3260-3269. doi: 10.1093/bioinformatics/btw396
15. Yakimovskii AF. Neurobiology of zinc. *Advances in current biology*. 2019;139(3):267-279. (In Russ.). doi: 10.1134/S0042132419030104
16. Okada AK, Teranishi K, Lobo F, Isas JM, Xiao J, Yen K, Cohen P, Langen R. The Mitochondrial-Derived Peptides, HumaninS14G and Small Humanin-like Peptide 2, Exhibit Chaperone-like Activity. *Sci Rep*. 2017 Aug 10;7(1):7802. doi: 10.1038/s41598-017-08372-5
17. Arakawa T, Niikura T, Kita Y. The biological activity of Humanin analogs correlates with structure stabilities in solution. *Int J Biol Macromol*. 2011 Jul 1;49(1):93-7. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.04.003
18. Galzitskaya, O.V., Galushko, E.I. Selivanova, O.M. Studies of the Process of Amyloid Formation by A β Peptide. *Biochemistry Moscow* 83, S62–S80 (2018). doi.org/10.1134/S0006297918140079

УДК 615.014.21:661.122

Решеткина Д.А., Соколова М.О., Полосков А.И.
Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова,
Санкт-Петербург
Darya.Reshetkina@pharminnotech.com

**Микронизация биологически активных комплексов как способ
повышения биодоступности лекарственных препаратов для местного
применения**

С получением новых биологически активных комплексов, входящих в лекарственные препараты для местного применения, стало необходимым повышать биодоступность таких комплексов. Микронизация может применяться как способ улучшения биодоступности. В статье приведены различные технологические аспекты микронизации биологически активных комплексов в лекарственных препаратах для местного применения.

Ключевые слова: растворимость в воде, проницаемость, измельчение, гомогенизация, технологии осаждения.

Reshetkina D.A., Sokolova M.O., Poloskov A.I.
Kirov Military Medical Academy
Saint Petersburg

**Micronization of biologically active complexes – a way to increase
the bioavailability of topical drugs**

Obtaining new biologically active complexes that are included in the topical drugs, gave rise to the study of the micronization process in order to increase the bioavailability of this complexes. The article presents various technological aspects of micronization of biologically active complexes for topical drugs.

Key words: water solubility, penetration, milling, homogenization, precipitation technologies.

Введение. Создание лекарственных препаратов (ЛП) сопровождается прогнозированием временных характеристик, нахождением альтернативных путей введения лекарственного средства (ЛС) и минимизацией системного влияния действующих веществ при одновременном сохранении локального действия препарата на ткани. Для осуществления этих задач при фармацевтической разработке более детально изучают физико-химические и технологические свойства

биологически активных комплексов, довольно часто улучшают данные свойства с помощью внедрения в технологию новых методов и введения вспомогательных веществ [1,2]. Помимо этого, для многих биологически активных комплексов решается проблема растворимости в воде.

В соответствии с данными биофармацевтического классификатора все разработанные и разрабатываемые биологически активные соединения делятся на 4 группы по растворимости и проницаемости. В настоящее время все чаще вновь синтезируемые комплексы при классификации по причине низкой растворимости в воде вносят в группы II или IV (см. рис. 1).



Рис. 1. Классификация фармакологических веществ в зависимости от растворимости и проницаемости

Наиболее трудны при разработке лекарственной формы (ЛФ) вещества IV группы, потому что именно для них характерна низкая растворимость и низкая проницаемость.

Известно, что лекарство, введенное в виде раствора, быстрее попадает в кровь или клетки, чем лекарство, введенное в виде суспензии [1]. Поэтому на сегодняшний день для повышения растворимости в воде и, тем самым, повышения эффективности, применяют методы микронизации веществ [1].

Микронизация – это уменьшение размера частиц вещества до 10 мкм и менее. Методы микронизации разделяют на две группы: top-down («сверху-вниз») подход и bottom-up («снизу-вверх») подход. Top-down подход базируется на измельчении вещества в растворе с

последующей гомогенизацией. Bottom-up подход основан на методах преципитации (осаждения) [1].

Top-down подход в микронизации. Подход «сверху-вниз» включает в себя как простое измельчение с помощью различных конфигураций мельниц, так и различные виды гомогенизации.

Измельчение (milling technology) Измельчение является механическим процессом производства порошков с целью уменьшения частиц большого размера до микро- и наночастиц. Измельчение проводят с помощью струйных или шаровых мельниц, при этом вещество может быть как сухим, так и влажным. С помощью таких мельниц образуются частицы диаметром меньше 5 мкм. В зависимости от технологии измельчения физические свойства порошка могут стать различны и значительно повлиять на его растворимость в воде [3].

Существуют различные виды измельчения, которые кратко будут описаны.

Сухое измельчение (dry milling). В настоящее время сухое измельчение достаточно редко применяется при микронизации лекарственных препаратов для местного применения, так как при таком виде измельчения образуются частично аморфные вещества с поверхностным зарядом, приводящим в некоторых случаях к образованию агломератов. Данную проблему возможно устранить с помощью влажного измельчения или других специализированных методов [3].

Влажное измельчение (wet milling) – процесс измельчения вещества с применением воды, при котором возможно получение наночастиц. В общей технологии влажное измельчение более популярно из-за простоты и масштабируемости процесса, однако при микронизации биологически активного комплекса с целью повышения проницаемости и растворимости в воде данный вид измельчения не применяется.

Измельчение в кипящем слое (fluid energy milling). При таком типе измельчения применяется струйная мельница (мельница кипящего слоя), которая создает в ходе процесса частицы диаметром около 25 мкм путем их удара в потоке воздуха. Сжатый воздух образует высокоскоростной поток, который проходит через воронку подачи и увлекает вещество в измельчительную камеру [3].

В процессе измельчения дополнительно подается сжатый воздух через сопла, установленные вокруг измельчительной камеры, тангенциально для создания вращательного движения потока. Центробежный поток воздуха ускоряет движение частиц и за счет их ударного воздействия между собой уменьшает размер. Большие частицы движутся по периметру камеры. По мере уменьшения размеров частицы перемещаются к центру, где они выносятся потоком из камеры.

Для снижения содержания аморфных частей в порошке, полученным таким способом измельчения, и осуществления кристаллизации *in situ* измельчение в кипящем слое может проводиться при повышенной влажности. Также при таком осуществлении процесса образуется более кристаллический порошок с однородным размером частиц по сравнению с конвекционным измельчением.

Система контролирует относительную влажность (например, 30-70%) в измельчительной камере с помощью подачи входящего газа определенной влажности (например, нагретый поток для минимизации конденсации).

Высокоэффективная гомогенизация. Высокоэффективной гомогенизацией называется механический процесс, применяемый для уменьшения размера частиц плохо растворимых веществ. Данный подход к получению порошка имеет несколько технологий, зависящих от используемого оборудования и условий проведения процесса [2,4,5].

Технология микрофлюидизации (Microfluidizer technology). Для осуществления данной технологии применяется пароструйный гомогенизатор (микрофлюидизатор) [1,2]. При этой технологии образуются наночастицы с помощью их столкновения, усилий сдвига и кавитации, которые являются результатом фронтального столкновения двух потоков под давлением, приблизительно равным 1700 бар, которое может уменьшить частицы до наноразмеров [5]. В ходе осуществления технологии обычно применяются поверхностно-активные вещества (ПАВы) для стабилизации желаемого размера частиц порошка. В большинстве случаев для обеспечения значительного уменьшения размера частиц необходимо процесс повторить 50-100 раз.

Плунжерная гомогенизация (с использованием гомогенизатора плунжерно-клапанного типа) (Piston-gap homogenization). Получение частиц в этом процессе основывается на образовании кавитационных сил в высокоэффективных гомогенизаторах плунжерно-клапанного типа.

Суспензия действующего вещества и ПАВ проходит через очень маленький зазор (отверстие, проход) гомогенизатора под давлением около 1500 бар. Обычно выполняется 3-20 таких циклов гомогенизации [5].

Благодаря маленькому проходу, высокая скорость потока суспензии и увеличенное динамическое давление жидкости в соответствии с законом Бернулли компенсируются снижением статического давления на жидкость температуры кипения воды при комнатной температуре. Следовательно, вода начинает испаряться при комнатной температуре, и, когда жидкость покидает проход гомогенизатора, с

помощью этого разрежения образуются пузырьки газа. Это индуцирует кавитационные волны, которые и формируют частицы с помощью сдвига [5].

Существуют различные подходы к получению порошка с помощью гомогенизатора плунжерно-клапанного типа.

Достоинствами высокоэффективной гомогенизации (ВЭГ) являются:

- различный диапазон производительности ВЭ гомогенизаторов от нескольких сот до нескольких тысяч литров в час, что позволяет производить широкий спектр систем доставки лекарств;
- изменение степени кристаллизации лекарства за счет процесса ВЭГ;
- возможность использования гомогенизации после быстрой преципитации для дальнейшего измельчения частиц.

Недостатком ВЭГ является образование в некоторых случаях аморфной фракции, что повлияет на стабильность препарата [5].

Распылительная сушка (Spray drying technology). В 1940-х годах распылительная сушка была прорывом и многообещающим методом для создания нано- и микрочастиц с желаемыми характеристиками для изготовления ЛП, но в настоящее время для микронизации ЛП местного применения возможно применять только метод испарения низкокипящих растворов. Данный тип испарения заключается в простом растворении вещества в низкокипящем растворителе, последующем распылении и испарении растворителя с образованием сухого порошка [3].

Технология преципитации (осаждения) (Precipitation Technology). Технология осаждения — одна из старинных методов для изготовления микро- и наночастиц. Общий принцип заключается в том, что вещество растворяют в растворителе, а затем добавляется антирастворитель, приводящий к осаждению мелкодисперсных частиц [1,4,5].

Контролируемая кристаллизация (Direct controlled crystallization). Контролируемая кристаллизация гидрофобных веществ до необходимых размеров может быть получена техникой осаждения антирастворителем с использованием замедляющего рост стабилизатора (например, гидроксиметилцеллюлозы). В результате процесса образуются частицы размером 0,2 – 5 мкм, имеющие ромбовидную или овальную формы. Эти кристаллы более стабильны по сравнению с такими же композициями, приготовленными с помощью различных видов сушки.

Технология с использованием сверхкритической жидкости (Supercritical fluid technology). Данный подход применяется при разработке микро- и наночастиц прямо из растворов вещества. Сверхкри-

тические жидкости имеют свойства газа и жидкости при температуре выше критической температуры [2]. Чаще всего, в фармацевтической отрасли используется углекислый газ, потому что он имеет низкие критические точки температуры и давления, невзрывоопасен, нетоксичен, недорогой. Сверхкритический флюид (SCF) может служить как растворителем, так и антирастворителем [2,5].

Быстрое расширение сверхкритических растворов

Подход заключается в распылении раствора вещества под высоким давлением в SCF в область низкого давления. Затем поток проходит через отверстие и, тем самым, создается высокое сверхперенасыщение. Этот процесс не применяется для веществ, чья растворимость в SCF высока (более 10^{-3} кг/кг).

Существуют и другие подходы в технологии с использованием SCF: быстрое расширение жидкостно-газового раствора с последующей гомогенизацией и использование сверхкритического антирастворителя [5].

Для каждого разрабатываемого биологически активного комплекса определяется растворимость в воде, разрабатывается своя технология введения в лекарственную форму. При необходимости повышения растворимости комплекса все чаще применяются различные методы микронизации, которые также модернизируются.

Список литературы

1. Матушевская, Е.В. Эффективность и безопасность микронизированных лекарственных препаратов и их применение в дерматологической практике/ Е.В. Матушевская, Е.В. Свирщевская // клиническая дерматология и венерология. 2015. № 5. С. 4-10.
2. Матушевская, Е.В. Технологии микронизации лекарственных препаратов: новые возможности топических глюкокортикостероидов в дерматологии/ Е.В. Матушевская, Е.В. Свирщевская // клиническая дерматология и венерология. 2017. № 1. С. 43-48.
3. Меньшутина, Н.В. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства / Н.В.Меньшутина, Ю.В.Мишина, С.В.Алвес. Т.1. М.: Издательство БИНОМ, 2016. 328с., ил.
4. Müller, R.H. Manufacturing of Nanoparticles by milling and homogenization technique / R.H. Müller, J.Möschwitzer, F.N.Bushrab// Nanoparticle technology for drug delivery.-2006.- P. 21-51.
5. Bruno R. P. Microfluidizer® processor technology for high performance particle size reduction, mixing and dispersion/R.P.Bruno, R.McIlwrick //Paperback APV. 2001. Т. 42. P. 77-89.

УДК 615.281.8

*Сальникова О.П.¹, Фатьянова А.В.¹,
Яровая О.И.^{1,2}, Салахутдинов Н.Ф.^{1,2}*
Новосибирский государственный университет¹,
ФГБУН Новосибирский институт органической химии
им. Н.Н. Ворожцова СО РАН²
Новосибирск
E-mail: Сальникова О.П. - lelka515@yandex.ru
Фатьянова А.В. - allium@list.ru
Яровая О.И. - ooo@nioch.nsc.ru
Салахутдинов Н.Ф. - anvar@nioch.nsc.ru

Активность трансфераз крови в условиях длительного введения разных дозировок нового противовирусного агента камфецина

Изучена активность трансфераз крови при введении камфецина (1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-илиден-аминоэтанола). Выявлено, что введение камфецина в течение 5 суток в дозировках 25 и 50 мг/кг является более безопасным по сравнению с римантадином. Повышение дозировки камфецина до 100 мг/кг приводит к снижению ферментативной активности АЛТ и ГГТ.

Ключевые слова: камфецин, римантадин, АЛТ, АСТ, ГГТ, печень.

*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

Blood transferases activity under long-term administration of various doses of new antiviral agent camphecin

The activity of blood transferases was studied under administration of camphecin (1,7,7-trimethylbicyclo [2.2.1]heptan-2-ylidene-aminoethanol). Camphecin administration to rats during 5 days at doses of 25 and 50 mg / kg was safer than rimantadin. An increase in camphecin dose up to 100 mg / kg resulted in the ALT, and GGT enzymatic activity decrease.

Key words: camphecin, rimantadin, ALT, AST, GGT, liver.

Введение. Вирусы гриппа А (IAV) быстро вырабатывает резистентность к лекарственным средствам [1]. На смену семейству блокаторов

м-протонных каналов, к которым уже сформировалась резистентность [2, 3], в НИОХ СО РАН был синтезирован новый противовирусный агент Камфецин (1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанол), обладающий активностью в отношении поверхностного гликопротеина НА вируса гриппа. Это соединение на основе камфоры, которое показало высокую эффективность ингибирования репродукции вирусов гриппа А Н1N1, Н3N2, Н5N2 и гриппа В и низкую токсичность [4, 5]. Исследования 2018 года показали, что камфецин метаболизируется в печени с образованием трех продуктов: глюкуронид камфецина, иминокислота камфецина и сульфат камфецина, изучена фармакокинетика камфецина и его метаболитов в печени, легких и почках. Часть вещества выводится из организма с мочой без изменений [6]. Исходя из того, что основные метаболические процессы нового противовирусного агента, так же как и препарата сравнения римантадина [7] происходят в печени, основным объектом исследования явилась функциональная реакция этого органа на введение лекарственных агентов. Известно, что на функциональное состояние печени указывают уровни активности трансфераз крови: АЛТ, АСТ и ГГТ [8, 9].

В ходе эксперимента самкам крыс линии WAG с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным производили введение лекарственных агентов один раз в сутки внутривенно. Эксперимент был разделен на две серии. В первой серии лекарственные агенты вводили четырем группам экспериментальных животных в течение 5 суток: контроль (введение физиологического раствора), камфецин (25 мг/кг и 50 мг/кг), римантадин (100 мг/кг). Во второй серии проводили введение агентов 6 группам животных в течение 7 и 14 суток: по две группы контроля (введение физиологического раствора), камфецина (100 мг/кг) и римантадина (100 мг/кг). Определение активности АЛТ, АСТ и ГГТ в плазме крови проводили с использованием биохимических методик. Достоверность различий между группами оценивали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок с использованием пакета программ Statistica 8.0. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. В работе данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего ($M \pm SEM$).

Результаты. В ходе первой части эксперимента было выявлено, что уровень активности АЛТ в группах введения камфецина (25 и 50 мг/кг) достоверно ниже, чем в группе римантадина ($p < 0,01$), но выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$, табл. 1). Уровень активности АСТ в группах введения камфецина в дозе 50 мг/кг и ри-

мантадина по сравнению с группой введения камфецина в дозировке 25 мг/кг ($p < 0,01$, табл. 1) достоверно снижается. Достоверных различий уровня активности ГГТ между экспериментальными группами выявлено не было (табл. 1).

В ходе второй серии эксперимента достоверных различий между группами контроля обнаружено не было, поэтому их объединили в единую группу. Камфецин при введении в течение 7 суток вызвал достоверное снижение активности АЛТ по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$, табл. 2). Введение римантадина в течение 7 суток привело к наибольшему увеличению активности АЛТ по сравнению с группой камфецина 7 суток ($p < 0,01$). При введении римантадина в течение 14 суток, напротив, достоверно снижается уровень активности АЛТ по сравнению с группами введения римантадина в течение 7 суток ($p < 0,01$) и контроля ($p < 0,001$). Выявлено достоверное снижение уровня активности АСТ в группе введения камфецина в течение 7 суток ($p < 0,01$, табл. 2). Обнаружено достоверное уменьшение активности ГГТ в плазме крови группы введения камфецина в течение 7 суток по сравнению с группами контроля ($p < 0,001$, табл. 2), введения римантадина в течение 7 суток ($p < 0,05$) и введения камфецина в течение 14 суток ($p < 0,01$). Также уровень активности ГГТ уменьшился в группе введения римантадина в течение 7 суток по сравнению с группами контроля ($p < 0,01$) и введения римантадина в течение 14 суток ($p < 0,05$).

Обсуждение и выводы. Анализ полученных данных показал, что камфецин при введении в дозировках 25 и 50 мг/кг в течение 5 суток обладает более мягким действием на гомеостаз АЛТ по сравнению с римантадином. Это может указывать на отсутствие негативного влияния нового противовирусного агента на функциональные показатели печени, так как наибольшая концентрация этого фермента обычно регистрируется в цитоплазме гепатоцитов [10]. Наблюдаемое незначительное повышение активности АЛТ в плазме крови животных из групп введения камфецина в дозировках 25 и 50 мг/кг может свидетельствовать об изменениях в работе гепатоцитов в пределах физиологической нормы. Достоверного влияния камфецина на активность АСТ и ГГТ по сравнению с группой контроля не выявлено, что позволяет транферазам выполнять свои функции в полном объеме.

При введении высокой дозировки (100 мг/кг) камфецина в течение 7 суток наиболее существенным является снижение уровня активности ГГТ. Известно, что ГГТ локализуется преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме и в желчевыводящих путях, уча-

ствует в защите клеток от окислительного стресса [11]. Вероятно, наблюдаемый эффект связан с активизацией механизмов, препятствующих развитию окислительного стресса [12]. Выявленное повышение уровня активности ГГТ у обеих групп введения лекарственных агентов в течение 14 суток по сравнению с группами введения агентов в течение 7 суток может указывать на установление равновесия в системе гомеостаза ГГТ.

Таким образом, камфецин, в отличие от римантадина, при введении в течение 5 суток в дозировках 25 и 50 мг/кг оказывает более мягкое влияние на работу печени как одного из ведущих органов поддержания биохимического гомеостаза. Повышение дозировки камфецина до 100 мг/кг в условиях длительного введения (7 суток) приводит к уменьшению ферментативной активности (АЛТ, ГГТ) по сравнению с римантадином, однако увеличение срока введения до 14 суток приводит к развитию компенсаторных реакций. Следует отметить, что рекомендованная доза камфецина, проявляющая выраженный противовирусный эффект составляет 20 мг/кг.

Приложения:

Таблица 1. Активность трансфераз крови в условиях 5-суточного введения камфецина и римантадина

Экспериментальная группа	АЛТ (Ед/л)	АСТ, (Ед/л)	ГГТ, (Ед/л)
Контроль	459,56±4,10	395,10±9,98	241,66±23,62
Камфецин, 25 мг/кг	477,75±2,96 *	423,69±0,90	276,59±24,95
Камфецин, 50 мг/кг	480,48±1,30 **	400,63±4,44 @@	250,92±14,48
Римантадин, 100 мг/кг	501,51±3,74 ***, @@, &&	409,23±2,48 @@	222,94±15,67

Примечание: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 по сравнению с контролем; @@ p<0,01 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.

Таблица 2. Активность трансфераз крови при длительном введении лекарственных агентов

Экспериментальная группа	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	ГГТ, Ед/л
Контроль	520,37±10,82	418,51±9,44	125,31±4,71
Камфецин, 7 суток	458,72±7,16 **	403,11±16,03	77,17±4,9 ***
Римантадин, 7 суток	543,2±18,66 %%	469,29±26,97	93,94±3,91 **, %
Камфецин, 14 суток	483,62±14,74	457,08±6,45 **, %	119,37±9,2 %%
Римантадин, 14 суток	436,45±10,65 ***, ##	433,97±7,48	114,67±6,28 #

Примечание: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – по сравнению с контролем; % $p < 0,05$, %% $p < 0,01$ – по сравнению с группой введения камфецина в течение 7 суток; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ – по сравнению с группой введения римантадина в течение 7 суток.

Список литературы

1. Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. // Cell Host Microbe -2010 – 7(6) – P.440–451
2. Cady SD, Schmidt-Rohr K, Wang J, Soto CS, Degrado WF, Hong M. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. // Nature. 2010 – 463(7281)- P.689–692.
3. Kozakov D, Chuang GY, Beglov D, Vajda S. Where does amantadine bind to the influenza virus M2 proton channel? // Trends Biochem Sci. 2010 – 35(9) – P.471–475.

4. 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.
5. 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.
6. Rogachev A.D., Yarovaya O.I., Fatianova A.V., Lavrinenko V.A., Amosova E.V., Zarubaev 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.
7. Li F, Ma C, DeGrado WF, Wang J. Discovery of highly potent inhibitors targeting the predominant drug-resistant S31N mutant of the influenza A virus M2 proton channel. // *J Med Chem.* 2016 – 59 – P.1207–1216.
8. Otto-Ślusarczyk, D., Graboń, W., and Mielczarek-Putna, M. Aspartate aminotransferase—key enzyme in the human systemic metabolism. // *Postepy Hig. Med. Dosw.* - 2016 – 70 – P.219–230
9. Krishna Das KV, Mathew Thomas, Sasidharan PK, Aswini Kumar S, Kasi Visweswaran R, Sudheendra Ghosh C., *Clinical Medicine: A Textbook of Clinical Methods and Laboratory Investigations*, Fourth Edition: 2013, Jaypee Brothers Medical Publishers. P.820.
10. Sookoian S, Pirola CJ. Alanine and aspartate aminotransferase and glutamine-cycling pathway: their roles in pathogenesis of metabolic syndrome . *World J Gastroenterol* – 2012 – 18 – P.3775–3781.
11. Ndrepepa G, Kastrati A. Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease. *Ann Transl Med.* 2016;4(24):481
12. Priolo C., Damir Khabibullin, Ed Reznik, Harilaos Filippakis, Barbara Ogórek, Taylor R. Kavanagh, Julie Nijmeh, Zachary T. Herbert, John M. Asara, David J. Kwiatkowski, Chin-Lee Wu, Elizabeth P. Henske., Impairment of gamma-glutamyl transferase 1 activity in the metabolic pathogenesis of chromophobe renal cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018; 115 (27): 6274-628

Saraeva T.A.
ГОУ ВО ЛНР «Луганский государственный
педагогический университет», Луганск
sara-chem@mail.ru

**Соли хинолиния в синтезе новых производных
тетрагидропирроло[1,2-*a*]хинолинов**

*В статье рассмотрен синтез 1,2,3,3а-тетрагидропирроло[1,2-*a*]хинолинов на основе бромиды *N*-(2,4,5-триметилбензоилметил)хинолиния и активированных олефинов.*

Ключевые слова: соли хинолиния, активированные олефины, тетрагидропирроло[1,2-*a*]хинолины.

Saraeva T.A.
SEI HE LPR «Lugansk state pedagogical university», Lugansk

**Quinolinium salts in the synthesis of new derivatives
tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]quinolines**

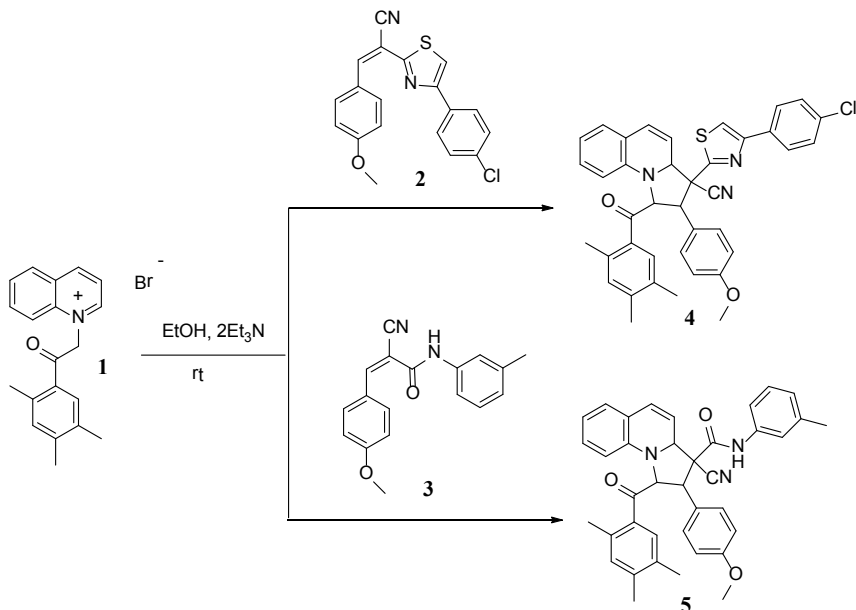
*This article describes the synthesis of 1,2,3,3a-tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]quinolines based on *N*-(2,4,5-threemethylbenzoilmethyl)quinolinium bromide and activated olefins.*

Key words: quinolinium salts, activated olefins, tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]quinolines.

Наиболее распространенным методом синтеза биологически активных конденсированных производных хинолина является реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения солей хинолиния к алкенам [1-3]. Для получения новых 1,2,3,3а-тетрагидропирроло[1,2-*a*]хинолинов в настоящем исследовании мы изучили взаимодействие бромиды *N*-(2,4,5-триметилбензоилметил)хинолиния **1** с активированными олефинами **2** и **3** при комнатной температуре в этаноле в присутствии триэтиламина. Установлено, что в обоих случаях образуются ожидаемые продукты **4** и **5** соответственно.

Строение синтезированных соединений подтверждено данными ЯМР ¹H и ¹³C-спектроскопии.

В ЯМР ¹H спектрах соединений **4** и **5** присутствуют сигналы СН-протонов тетрагидроиндолизиновых циклов в области 4.08–6.01 м.д., сигналы метильных и метоксильных групп в области 1.87–2.40 м.д. и 3.74–3.75 м.д. соответственно, а также характерные сигналы ароматических протонов.



В спектрах ЯМР ¹³C соединений **4** и **5** присутствуют сигналы (C²), (C¹), (C^{3a}), (C³) в области 54.03–71.34 м.д., сигналы СН₃- и ОСН₃-групп в области 18.81–21.54 м.д. и 55.38–55.40 м.д. соответственно. Также присутствуют сигналы СО-групп в области 197.28–206.06 м.д.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определили на блоке Кофлера. Спектры ЯМР ¹H и ¹³C получены на приборе Bruker Avance-400 (400 МГц) в растворе ДМСО-*d*₆ внутренний стандарт – ТМС. Индивидуальность полученных соединений определяли с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системе ацетон-гексан (3:5), проявитель – пары йода и УФ.

Методика получения 1,2,3,3a-тетрагидропирроло[1,2-a]хинолин-3-карбонитрила (4) и 1,2,3,3a-тетрагидропирроло[1,2-a]хинолин-3-карбоксамиды (5).

Смесь 1 ммоль соли хинолиния **1**, 1 ммоль олефина **2** или **3** и 2 ммоль триэтиламина перемешивают при комнатной температуре в 10 мл этилового спирта в течение 8 часов, оставляют на ночь при комнатной температуре. Полученный осадок отфильтровывают, промывают 5 мл этилового спирта.

2-(4-Метоксифенил)-1-(2,4,5-триметилбензоил)-3-(4-(4-хлорфенил)-тиазол-2-ил)-1,2,3,3a-тетрагидропирроло[1,2-a]хинолин-3-карбонитрил (4).

Выход (41%). Т. пл. 170°C. Спектр ЯМР ¹Н, δ, м.д., J/Гц: 7.95-7.92 (2H, м, C^{2''}H, C^{6''}H), 7.45-7.41 (3H, м, CH_{тиазол}, C^{3'''}H, C^{5'''}H), 7.28 (2H, д, C^{2''}H, C^{6''}H, J=8.8), 7.09 (1H, с, C^{6''}H), 6.98 (1H, с, C^{3''}H), 6.97-6.92 (2H, м, C^{8''}H, C^{9''}H), 6.81 (2H, д, C^{3''}H, C^{5''}H, J=8.8), 6.66-6.57 (2H, м, C^{6''}H, C^{7''}H), 6.01 (1H, д, C^{5''}H, J=7.9), 5.71 (1H, с, C^{4''}H), 5.63-5.57 (2H, м, C^{1''}H, C^{3a''}H), 4.08 (1H, д, C^{2''}H, J=8.2), 3.74 (3H, с, OCH₃), 2.40 (3H, с, CH₃), 2.16 (3H, с, CH₃), 1.87 (3H, с, CH₃). Спектр ЯМР ¹³С, δ, м.д.: 18.81 (CH₃), 19.78 (CH₃), 21.09 (CH₃), 55.40 (OCH₃), 57.82 (C²), 58.07 (C¹), 61.36 (C^{3a}), 71.34 (C³), 113.83, 114.25, 115.04, 117.32, 117.56, 119.87, 120.48, 121.79, 124.18, 125.62, 125.86, 128.20, 129.09, 130.75, 131.31, 132.64, 133.49, 133.74, 134.28, 136.68, 137.52, 137.80, 138.29, 139.06, 140.24, 141.61, 142.15, 148.15, 159.95, 161.61, 206.06 (C=O).

2-(4-Метоксифенил)-N-(m-толил)-1-(2,4,5-триметилбензоил)-3-циано-1,2,3,3a-тетрагидропирроло[1,2-a]хинолин-3-карбоксамид (5).

Выход (49%). Т. пл. 148°C. Спектр ЯМР ¹Н, δ, м.д., J/Гц: 9.67 (1H, уш. с, NH), 7.38 (1H, с, C^{6''}H), 7.36 (2H, с, C^{2''}H, C^{6''}H), 7.30 (1H, д, C^{9''}H, J=7.7), 7.16-7.10 (2H, м, C^{8''}H, C^{2'''}H), 6.96 (1H, с, C^{3''}H), 6.91 (3H, т, C^{4'''}H, C^{5'''}H, C^{6'''}H, J=8.3), 6.85 (2H, д, C^{3''}H, C^{5''}H, J=8.6), 6.58 (2H, д.д, C^{6''}H, C^{7''}H, J=18.9, 9.0), 5.96 (1H, д, C^{5''}H, J=8.2), 5.74 (1H, д, C^{3a''}H, J=10.0), 5.52 (1H, с, C^{4''}H), 5.45 (1H, д, C^{1''}H, J=8.0), 4.12 (1H, д, C^{2''}H, J=8.2), 3.75 (3H, с, OCH₃), 2.38 (3H, с, CH₃), 2.30 (3H, с, CH₃), 2.16 (3H, с, CH₃), 1.90 (3H, с, CH₃). Спектр ЯМР ¹³С, δ, м.д.: 18.82 (CH₃), 19.75 (CH₃), 21.09 (CH₃), 21.54 (CH₃), 54.03 (C²), 55.38 (OCH₃), 64.34 (C¹), 67.55 (C^{3a}), 69.01 (C³), 109.89, 114.24, 116.91, 117.75, 118.24, 119.53, 119.76, 122.97, 125.82, 126.53, 127.74, 128.39, 129.17, 129.47, 129.84, 130.55, 131.21, 132.14, 133.44, 133.63, 136.60, 137.66, 137.85, 141.35, 142.32, 159.83, 161.24, 197.28 (C=O), 199.99 (C=O).

Список литературы

1. Raynes K., Foley M., Tilley L., Deady L.W. Novel bisquinoline antimalarials: synthesis, antimalarial activity, and inhibition of haem polymerisation // Biochem. Pharmacol. 1996. Vol. 52, № 4. P. 551-559.
2. Chibale K., Moss J.R., Blackie M. [et al.]. New amine and urea analogs of ferrochloroquine: synthesis, antimalarial activity in vitro and electrochemical studies // Tetrahedron Lett. 2000. Vol. 41, № 32. P. 6231-6235.

3. Hazra A., Mondal S., Maity A [et al.]. Amberlite IRA-402 (OH) ion exchange resin mediated synthesis of indolizines, pyrrolo[1,2-a]quinolines and isoquinolines: antibacterial and antifungal evaluation of the products // Eur. J. Med. Chem. 2011. Vol. 46, № 6. P. 213

УДК 539.215.5

Степашкин Н.А.

Санкт-Петербургский государственный университет
Россия, Санкт-Петербург
stepashkin.nick17@gmail.com

ξ-Потенциал пленок Ленгмюра–Блоджетт стеариновой кислоты на поверхности раствора электролита

Электроповерхностные свойства (ξ-потенциал, плотность электрокинетического заряда σ°) регулярных многослойных пленок Ленгмюра–Блоджетт стеариновой кислоты были изучены в зависимости от pH=2-11 в присутствии KCl при $c=10^{-5} - 10^{-3}$ М в водных растворах. Значения ξ-потенциала были определены с помощью потенциала течения с использованием модифицированного уравнения Смолуховского. Из соответствующего уравнения модели Гуи-Чапмена для двойного электрического слоя был рассчитан электрокинетический заряд σ и значения константы поверхностной ионизации стеариновой кислоты в монослое.

Ключевые слова: пленки Ленгмюра–Блоджетт; стеариновая кислота; двойной электрический слой ξ-потенциал; константа ионизации.

Stepashkin N.A.

St. Petersburg State University
Russia, St. Petersburg
stepashkin.nick17@gmail.com

ξ-Potential of stearic acid Langmuir-Blodgett multy-layer's films on electrolytic solution surface

The electro-surface properties (zeta-potential, electrokinetic charge density) of the regular Langmuir-Blodgett multy-layer's films of stearic acid were studied as functions of pH=2 -11 in the presence of $c=10^{-5} - 10^{-3}$ M KCl in aqueous solutions. ξ-potential values were determined by the streaming potential technique using the Smoluchowski equation. From an appropriated equation of Gouy-Chapman model for electrical double layer, the dependencies σ and the

values of the surface ionization constant of stearic acid in the monolayer were calculated.

Key words: *Langmuir-Blodgett films; stearic acid; electrical double layer; ζ -potential; ionization constants.*

Метод Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ) является одним из наиболее эффективных инструментов для нанесения высокоорганизованных многослойных амфифильных молекул, нерастворимых в воде (пленок Ленгмюра–Блоджетт), на твердые подложки [1-3]. Основой данного метода является процесс последовательного переноса на подложку отдельных монослоев Ленгмюра, которые самостоятельно собираются на поверхности воды. Пленки ЛБ являются часто используемыми компонентами во многих технических устройствах, таких как датчики, детекторы, дисплеи, микрофлюидные устройства и компоненты электронных схем [4-6].

Получение пленок Ленгмюра–Блоджетт

Подложки из плавленого кварца промывают горячей серной кислотой, многократно промывают дистиллированной водой и обрабатывают диметилдихлорсиланом, чтобы сделать их поверхности гидрофобными.

Для определения значений поверхностного давления, соответствующего твердо-конденсированным состояниям монослоев стеариновой кислоты на водных субфазах, были измерены соответствующие изотермы поверхностного давления при температуре $20 \pm 1^\circ \text{C}$ с использованием пленочных весов Ленгмюра.

Последовательный перенос монослоев стеариновой кислоты и образование соответствующих пленок ЛБ Y-типа на подложках осуществлялось путем их медленного попеременного перемещения через монослой субфазы при постоянном поверхностном давлении 25 мН/м. Количество монослоев в пленках ЛБ было нечетным и варьировалось от 21 до 41. Количество и качество осажденных монослоев контролировалось значением коэффициента переноса, близким к 1 (соотношение между уменьшением площади монослоя во время хода осаждения и площадью подложки).

Результаты

Значения ζ -потенциала были рассчитаны по экспериментальному отношению потенциала течения к давлению с использованием уравнения Смолуховского, модифицированного с учетом поверхностной проводимости

$$\zeta = \frac{\eta}{\epsilon \epsilon_0} \frac{U_s}{P} \alpha K_v \quad (1),$$

где $\alpha = \bar{K}/K_v$ отношение проводимости раствора электролита в микроканале и в объеме. Поверхностная проводимость была рассчитана как

$$K_s = \frac{(\bar{K} - K_v)h}{2},$$

где h – ширина микроканала.

На рисунке 1 представлена зависимость ζ -потенциала пленок ЛБ стеариновой кислоты в зависимости от pH раствора при различных концентрациях KCl. Для сравнения на этой же рисунке представлена зависимость для частиц стеариновой кислоты, полученных разрушением монослоев ультразвуком. В данном случае исследование проводилось методом микроэлектрофореза. На рисунке отчетливо видно, что два различных электрокинетических метода дают примерно одинаковые результаты:

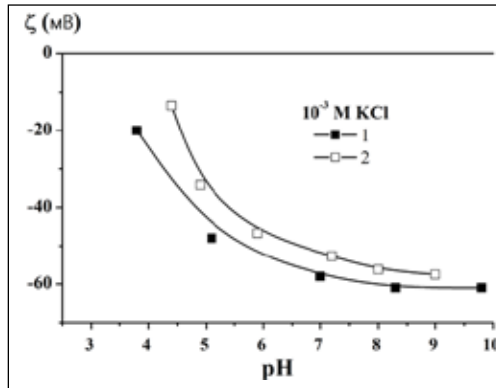


Рис. 1. Зависимость электрокинетического потенциала от pH раствора концентрации KCl $\chi=10^{-3}$ М, мультислоев стеариновой кислоты при рассчитанные по потенциалу течения в микроканале (2) и электрофоретической подвижности частиц (1) стеариновой кислоты, собранных на поверхности водной субфазы после разрушения монослоя

Все зависимости $\zeta(\text{pH})$ были использованы для оценки плотности электрокинетического заряда с использованием соответствующего уравнения модели двойного электрического слоя Гуй-Чепмена:

$$\sigma_{\zeta} = (8\epsilon_0\epsilon c RT)^{1/2} \sinh\left(\frac{e\zeta}{2kT}\right) \quad (2)$$

Соответствующие зависимости $\sigma_{\zeta}(\text{пН})$ представлены на рисунке 2: Зависимости $\sigma_{\zeta}(\text{пН}, \log \chi)$ были использованы для оценки истинных констант для реакций ионизации пленок стеариновой кислоты на водных поверхностях.

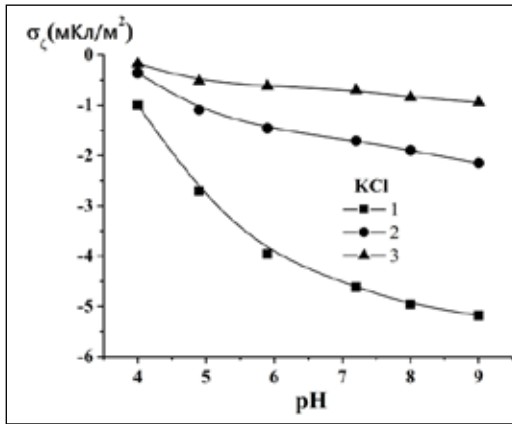
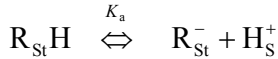


Рис. 2. Плотность электрокинетического заряда пленок ЛБ стеариновой кислоты в зависимости от рН при различных концентрациях КСl (1 – $c=10^{-3}$ М, 2 – $c=10^{-4}$ М, 3 – $c=10^{-5}$ М)

Согласно закону действующих масс для этих реакций и предполагая, что степень ионизации

$$\alpha = \left| \frac{\sigma_{\zeta}}{eN_s} \right|,$$

где e это заряд электрона и N_s – поверхностные плотности упаковки стеариновой кислоты в пленках ЛБ, были рассчитаны кажущиеся константы ионизации

$$pQ_a = \text{pH} - \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

и построены зависимости кажущихся констант ионизации в зависимости от $(A\alpha + \sqrt{c})$ (A является параметром масштабирования).

Методом двойной экстраполяции этих графиков к $c=0$ и $\alpha=0$ были определены истинные константы ионизации: $pK_a=7.5$ (рис. 3).

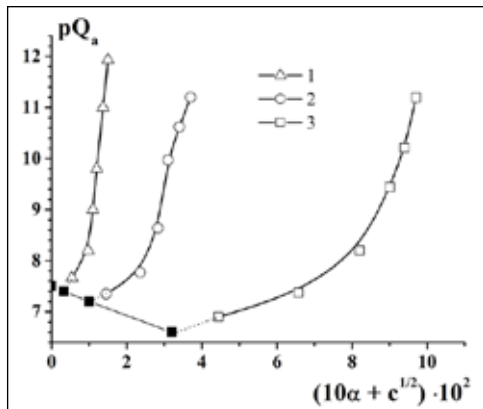


Рис. 3. Зависимость pQ_a от $(10\alpha + \chi^{1/2})$ для HSt при различных концентрациях KCl (1 – $c=10^{-5}$ М, 2 – $c=10^{-4}$ М, 3 – $c=10^{-3}$ М)

Значение $pK_a=7.5$ для стеариновой кислоты в организованной структуре намного выше, чем в соответствующей структуре $pK_a=4.8$ для молекул короткоцепочечных жирных кислот в объемном растворе, что можно объяснить основной ролью электростатического потенциала на границе раздела при контролируемой pK_a . Следует отметить, что Глазер и Доган [7], проводившие измерения поверхностного потенциала монослоев стеариновой кислоты на границе раздела воздух-водный раствор, получили значение pK_a равное 8.5, а с помощью сложного метода плоской поверхности для определения потенциала монослоя стеариновой кислоты на границе раздела воздух-вода Усуи и Хили [18] получили соответствующее значение pK_a , равное 4.8.

Список литературы

1. G. G. Roberts, Potential Applications of Langmuir-Blodgett Films, Langmuir-Blodgett Films (2013) 317–411. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3716-2_7
2. I. R. Peterson, I Langmuir-Blodgett films, J. Phys. D: Appl. Phys, 23(4) (1990) 379–395. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/23/4/001>
3. B. P. Binks, Insoluble monolayers of weakly ionising low molar mass materials and their deposition to form Langmuir-Blodgett multilayers,

Advances in Colloid and Interface Science, 34(C) (1991) 343–432. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(91\)80053-M](https://doi.org/10.1016/0001-8686(91)80053-M)

4. J. D. Swalen, D. L. Allara, J. D. Andrade, E. A. Chandross, S. Garoff, J. Israelachvili, et al., Molecular monolayers and films. A panel report for the Materials Sciences Division of the Department of Energy, Langmuir, 3(6) (1987) 932–950. <https://doi.org/10.1021/la00078a011>

5. M. Breton, Formation and Possible Applications of Polymeric Langmuir-Blodgett Films. A Review, Journal of Macromolecular Science, Part C, 21(1) (1981) 61–87. <https://doi.org/10.1080/00222358108080925>

6. Yanklovich M.A., Ivanov N.S., Sukhodolov N.G., Zhukov A.N., A study of the properties and composition of stearic acid monolayers on an aqueous subphase containing cadmium ions, Colloid Journal, 78(2) (2016) 277–280. DOI: 10.7868/S0023291216020166

7. J. Glazer, & M. Z. Dogan, Ionization of protein monolayers and related substances, Transactions of the Faraday Society, 49 (1953) 448–455. <https://doi.org/10.1039/tf9534900448>

8. S. Usui, & T. W. Healy, Zeta potential of stearic acid monolayer at the air-aqueous solution interface, Journal of Colloid and Interface Science, 250(2) (2002) 371–378. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8340>

УДК 539.215.5

Суходолов Н.Г.

*Санкт-Петербургский государственный университет
Россия, Санкт-Петербург,
sng196505@mail.ru*

Золь-гель синтез хромита лантана с помощью микроволнового излучения

Хромит лантана $LaCrO_3$ представляет интерес из-за своих необычных термоэлектрических, каталитических и оптических свойств. В данной работе рассмотрен золь-гель синтез хромита лантана с помощью реакции соосаждения в присутствии мочевины иницирированной микроволновым излучением. Полученные образцы охарактеризованы методом порошковой рентгеновской дифракции. Методом лазерной дифракции определены размеры полученных частиц, размер основного их количества составил порядка 310 нм. Морфология частиц хромита лантана исследованы методом сканирующей электронной микроскопии до и после обработки ультразвуком.

Ключевые слова: микроволновый синтез, наночастицы, хромит лантана.

Sukhodolov N.G.
St. Petersburg State University
Russia, St. Petersburg

Sol-gel synthesis of lanthanum chromite using microwave initiated

LaCrO₃ is promising for modern material science due to its extraordinary thermoelectric, catalytic and optical properties. Lanthanum chromite sol-gel synthesis based on microwave initiated co-precipitation reaction with presence of reductant is discussed in this article. X-ray powder diffraction method was used for characterization of synthesized LaCrO₃ sample. Particle sizes were measured by laser diffraction and it is shown that bulk quantity of particles has an approximate size of 310 nm. SEM investigations of LaCrO₃ particles before and after sonication were carried out.

Key words: *microwave synthesis, nanoparticles, lanthanum chromite.*

В связи с развитием в медицине и биологии новых методов, использующих особые свойства наноматериалов, встает вопрос о необходимости разработки простого метода получения наноматериалов, сохраняющие макроскопические характеристики материала и свойства, зависящие от размера. Так, например, наночастицы оксида железа Fe₃O₄, обладающие магнитными и сорбционными свойствами, используются для очистки крови [1], Селенид кадмия CdSe, сочетающий размерные и электрофизические свойства, используется как новый тип высокоселективных люминофоров [2].

В данной работе предложен новый способ синтеза хромита лантана. Метод основан на разложении нитратов хрома и лантана под действием микроволнового излучения в присутствии мочевины как восстановителя. Данный подход позволяет быстро получать наноразмерные частицы различных сложных оксидов и дает возможность получать и исследовать замещенные хромиты лантана. Основными достоинствами этого метода получения наночастиц можно считать простоту и малое количество оборудования и прекурсоров [3,4,5].

Синтез хромита лантана проводили микроволновым разложением раствора нитрата хрома (III) и шестиводного нитрата лантана (III) в присутствии мочевины. На первой стадии синтеза происходит разложение нитратов [6,7]. Это сопровождается бурным выделением различных оксидов азота и оксида углерода и приводит к образованию смешанного золя гидроксидов хрома (III) и лантана (III). Процесс протекает с большой скоростью и при сильном разогреве системы. Состав образующейся газообразной смеси сложен и трудно опреде-

лим. Затем происходит термическое разложение полученного золя с образованием хромита лантана.



Сильный микроволновый нагрев реакционной смеси обеспечивает быстрое образование большого числа зародышевой фазы и равномерное распределение оксидов металлов в них. А высокая скорость синтеза не позволяет наночастицам вырасти до значительных размеров [8]. Однако в результате сильного экзотермического эффекта отдельные частицы слипаются до микронных и более размеров.

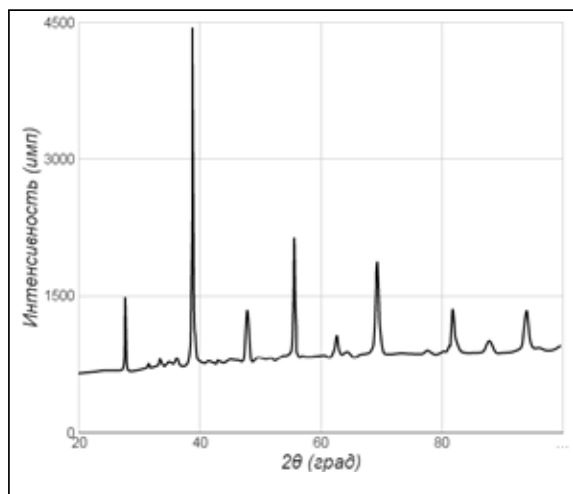


Рис. 1. Дифрактограмма полученного хромита лантана LaCrO_3 . Средний размер частиц измерен методом лазерной дифракции с использованием установки Mastersizer 3000 до и после обработки ультразвуком (40 кГц, 40 кВт, 2 минуты)

Объемное и штучное распределения агрегатов (рис. 2) рассчитаны и построены с использованием теории Ми.

Фазовый состав полученных образцов определен путем рентгенофазового анализа. Порошковые дифрактограммы снимались на дифрактометре Bruker «D2 Phaser» ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda=1,5414\text{\AA}$). Характеризация фаз проведена с использованием базы дифракционных данных «Powder Diffraction File» (PDF). Дифрактограмма синтезированного порошка (рис. 1) соответствует гексагональной фазе LaCrO_3 и не содержит пиков непрореагировавших солей или примесей.

Объемное распределение информативно в области больших значений, поскольку наибольший вклад в общий объем вносят крупные частицы. Из представленного распределения следует, что в образце присутствуют большие агрегаты размером в несколько сотен микрон. Однако, после обработки ультразвуком частиц более ста микрон в образце не наблюдается. Обработка полученных данных и их представление в виде штучного распределения позволяет говорить о том, частицы какого размера наиболее часто встречаются в образце. До ультразвуковой обработки максимум приходится на размер в 360 нм. После обработки пик немного смещается в область меньших размеров частиц и приходится на значение 310 нм. Малое изменение штучного распределения при обработке ультразвуком свидетельствует о том, что лишь незначительная доля частиц при перегреве в последней стадии синтеза участвует в образовании крупных агрегатов.

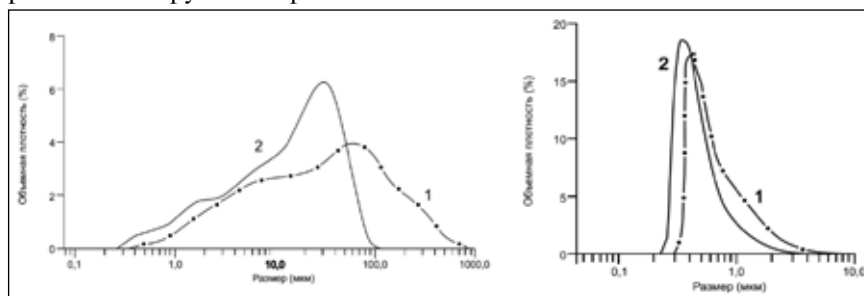


Рис. 2. Объемное (слева) и штучное (справа) распределения по размерам: 1 – для агрегированных частиц; 2 – для частиц после обработки ультразвуком в течение 2 минут, 40 кГц, 40 кВ

Для изучения морфологии полученных в результате синтеза частиц и характера их объединения проведены исследования методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе HITACHI S-3400N. Кроме того, методом СЭМ сделана качественная оценка результата обработки исходного образца ультразвуком.

На изображениях 3 а, б представлен образец до ультразвуковой обработки. На данных фотографиях хорошо видны большие пористые агрегаты неправильной формы с развитой поверхностью. Режим съемки в обратнорассеянных электронах (BSE) (а) показывает, что образец однороден по составу и имеет пористую структуру в объеме. Режим получения изображения во вторичных электронах (SE) (б) позволяет детально изучить структуру и оценить толщину стенок пор, которая составляет 50-100 нм.

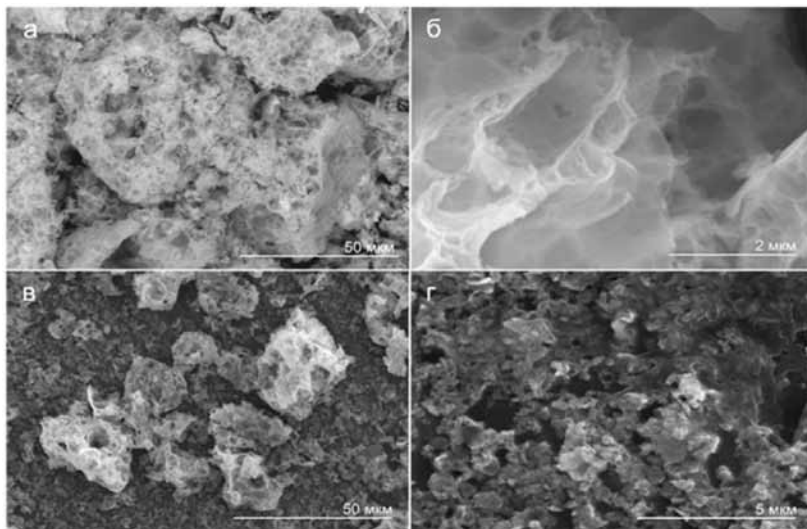


Рис. 3. Микрофотографии исходного образца в режиме обратнорассеянных электронов (а) и вторичных электронов (б); изображения в режиме вторичных электронов образца после обработки ультразвуком (в, г)

Как видно изображениях (в, г), под воздействием ультразвука наиболее крупные агрегаты разрушаются до размеров, соответствующих максимуму штучного распределения, определенного методом лазерной дифракции. Это открывает перспективы получения порошков, состоящих из отдельных наночастиц сложных оксидов при более интенсивной ультразвуковой обработке.

В результате проведенного исследования предложена методика получения наночастиц LaCrO_3 , не требующая работы с токсичными и дорогими прекурсорами. Получение однофазного хромита лантана подтверждено методом рентгенофазового анализа. В ходе синтеза получена полидисперсная смесь, содержащая как отдельные частицы порядка 0.3 мкм, так и небольшое число агрегатов, достигающих размера сотен микрон, обладающих повышенной пористостью. Крупные агрегаты разрушаются при ультразвуковой обработке до микронных размеров. Штучное распределение показывает, что значительная часть образующихся в ходе синтеза частиц не образуют агрегаты.

В работе использовано оборудование РЦ «Геомодель», РЦ «ИТКН», РЦ «РДМИ» Научного парка СПбГУ.

Список литературы

1. Гладилович В. Д., Шрейнер Е. В., Дубровский Я. А. и др. Исследование специфических свойств регулярного мультимолекулярного сорбента Fe(III) // Науч. приборостроение. 2013. Т. 23, № 1. С. 106–114.
2. Jie Bao, Mounqi G. Bawendi, A colloidal quantum dot spectrometer // Nature, 523, 67–70.
3. K. Rida, A. Benabbas, F. Bouremmad, M.A. Peña, E. Sastre, A. Martínez-Arias, Effect of strontium and cerium doping on the structural characteristics and catalytic activity for C₃H₆ combustion of perovskite LaCrO₃ prepared by sol–gel // Applied Catalysis B: Environmental, Volume 84, Issues 3–4, 1.12.2008, pp 457–467
4. Qiwu Zhang, Jinfeng Lu, Fumio Saito, Mechanochemical synthesis of LaCrO₃ by grinding constituent oxides // Powder Technology, Volume 122, Issues 2–3, 22 January 2002, pp 145–149
5. Xifeng Ding, Yingjia Liu, Ling Gao, Lucun Guo, Synthesis and characterization of doped LaCrO₃ perovskite prepared by EDTA–citrate complexing method // Journal of Alloys and Compounds, Volume 458, Issues 1–2, 30 June 2008, pp 346–350
6. Колоницкий П. Д., Суходолов Н. Г., Микроволновый синтез оксида хрома // Вестник СПбГУ. Сер. 4. Т. 2 (60). 2015. Вып. 1
7. Селютин А. А., Колоницкий П. Д., Суходолов Н. Г., Шрейнер Е. В., Краснов Н. В., Подольская Е. П. Синтез и характеристика нанорегулярных сорбентов на основе оксида циркония // Науч. приборостроение, 2013, том 23, № 1, с. 115–122.
7. Ying-Jie Zhu, Feng Chen, Microwave-Assisted Preparation of Inorganic Nanostructures in Liquid Phase // Chem. Rev., 2014, 114 (12), pp 6462–6555.

УДК 577.121:616-005.1

*Таканаев А.А., Яроватая М.А., Юшкова Е.И.
ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет
имени И.С. Тургенева»
Россия, Орел
chemistry.med@yandex.ru, maya0330@mail.ru, elen_yushkova@mail.ru*

Синтез и фармакологические свойства йодметилат поли-(β-гексаметиленимин)-этилакрилата как практическое применение элективного курса «Композитные материалы в медицине»

Практическое участие в элективном курсе повышает шанс для студента продолжить дальнейшее обучение в аспирантуре или ординатуре.

Преподаватели получают возможность внедрить в образовательный процесс свои научные достижения. Данная работа посвящена синтезу и исследованию нового канцеролитика йодпроизводного гексаметиленмина в рамках элективного курса «Композитные материалы в медицине».

Ключевые слова: *композитные материалы в медицине, биополимеры, фармакокинетика, фармакодинамика, гемостатики, биотрансформация.*

*Takanaev A.A., Yarovataya M.A., Yushkova E.I.
FSBEI HE «Orel State University named after I.S. Turgenev»
Russia, Orel*

Synthesis and pharmacological properties of poly-(β -hexamethylenimine)-ethylacrylate as a practical application of an elective course “Composite materials in medicine”

Practical participation in an elective course increases the student’s chance to continue further studies at a postgraduate or residency training level. Teachers get the opportunity to introduce their scientific achievements into the educational process. This work is devoted to the synthesis and research of a new carcinolytic of the iodine-derived hexamethylenimine in the elective course “Composite materials in medicine”.

Key words: *composite materials in medicine, biopolymers, pharmacokinetics, pharmacodynamics, haemostatic agents, biotransformation.*

Одной из форм инновационных педагогических технологий в области высшего медицинского образования являются элективные курсы (курсы по выбору студентов). Элективная форма обучения позволяет сочетать базовое классическое образование с профессиональной специализацией по конкретной тематике. Современный специалист должен владеть не только необходимой суммой фундаментальных и специальных знаний, но и определёнными навыками творческого решения практических задач. Начало научных исследований на студенческой скамье повышает глубину и качество овладения учебной программой, помогает молодому человеку быстрее формировать научное мировоззрение и развивать природные дарования.

Практическое участие в элективном курсе дает возможность студенту продолжить дальнейшее обучение будущей специальности. Следует отметить, что и преподаватели, включившиеся в работу по реализации электива, так же получают возможность внедрить в образовательный процесс свои научные достижения, разработать и апро-

бировать свой авторский курс с перспективой внедрения в рабочую программу, повысить свое педагогическое мастерство, престиж и статус.

Особое значение имеют междисциплинарные элективные курсы, позволяющие ознакомиться с новейшими результатами исследований в смежных, пограничных областях науки и техники. На стыках наук часто выявляются новые и важные открытия. Мы включили в данную статью некоторые научные разработки [2, 5, 7], полученные на стыке биохимии, медицины, фармакологии как практическую часть элективного курса «Композитные материалы в медицине». В данной работе приводится получение полимерного йодпроизводного гексаметилен с последующим изучением его гемостатической активности.

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, помещали 5 г (0,027 М) в 80% этаноле β-гексамтиленимин этилакрилата и 0,25г (0,5% от веса мономера) инициатора полимеризации – ДАК. Полимеризацию проводили в токе азота при 70°С в течение 4 часов. Полученный полимер осаждали гексаном и высушивали в вакууме при комнатной температуре. Выход: 4,9 г (98% от теоретического) [1, 3].

Химическое строение полученного полимера было подтверждено ИК-спектрами: полоса поглощения в области 1645 см⁻¹, характерная для ненасыщенной группы СН₂=СН- отсутствует, что свидетельствует о полимеризации мономера по двойной связи. При этом все остальные полосы поглощения, характерные для исходного мономера остаются неизменными ММ 6000-8000.

В табл. 1 и 2 приведены данные о влиянии йодметилата поли-(β-гексамтиленимин)-этилакрилата на время кровотечения, величину кровопотери и биохимические показатели процесса свертывания крови.

Таблица 1. Влияние йодметилат поли-(β-гексамтиленимин)-этилакрилата на время кровотечения и величину кровопотери у крыс

Показатели		Контроль	Опыт через 1 час после введения
Время кровотечения, в секундах	М±	445±45	180±35
	Р	-	0,001
	%	100	30
Величина кровопотери, в мг	М±	400±40	22±22
	Р	-	0,001
	%	100	50

Таблица 2. Влияние йодметилат поли-(β-гексамктиленимин)-этилакрилата на биохимические показатели процесса свертывания крови у крыс при в/в препарата

Доза	Показатели		Время после введения препарата в мин.			
	Тесты	Статистический показатель	Исход.	30	60	120
3мг/кг	Время свертывания крови в сек	M±	215±18	136±10	124±11	127±11
		P	-	0,05	0,001	0,001
		%	100	63	58	59
	Рекальцифик. плазмы в сек.	M±	96±10	58±6	60±4	73±4
		P	-	0,01	0,01	0,05
		%	100	60	62	76
	Толерантность плазмы к гепарину в сек.	M±	245±21	140±12	170±14	113±10
		P	-	0,01	0,01	0,001
		%	100	57	69	46
	Ретракция сгустка в сек.	M±	22±2	14,5±2	10,3±1	12,2±1
		P	-	0,01	0,001	0,01
		%	100	66	47	56
10 мг/кг	Время свертывания крови в сек	M±	300±26	140±15	160±18	205±24
		P	-	0,01	0,01	0,01
		%	100	47	53	67
	Рекальцифик. плазмы в сек.	M±	100±8	65±5	52±4	70±6
		P	-	0,01	0,01	0,01
		%	100	65	52	70
	Толерантность плазмы к гепарину в сек.	M±	277±30	230±20	200±22	235±20
		P	-	0,05	0,05	0,05
		%	100	83	72	82
	Ретракция сгустка в сек.	M±	35±1	23±2	20±2	19±5
		P	-	0,01	0,01	0,01
		%	100	66	57	54

Как видно из полученных данных при в/в введении препарата в дозе 10 мг/кг время свертывания крови сокращалось через 30-60-120 минут, соответственно, на 53-48-38%, а толерантность плазмы к ге-

парину повысилась на 17-28-28%. Ретракция сгустка сократилась на 34-43-46% . При введении препарата в дозе 3 мг/кг время свертывания крови через 30-60-120 минут сокращалось на 37-42-41%, рекальцификация плазмы на 40-38-34%, толерантность плазмы к гепарину повысилась на 43-31-54%. Время ретракции сгустка сократилось на 34-53-44%, следовательно, препарат действует на I и II фазы свертывания крови. Дицинон за те же самые интервалы времени сокращает время свертывания крови на 40-50%, время рекальцификации плазмы на 33-39% и повышает толерантность к гепарину на 30-40% [4, 6]. Таким образом, новый препарат не уступает по своей гемостатической активности дицинону, но действует в меньших дозах [8].

Итак, в результате проведенной нами работы выработаны определенные подходы к исследованию биотрансформации гетероциклических аминов и их производных, включающие влияние на процессы метаболизма и фармакокинетики таких факторов, как структура, биологическая активность и патологическое состояние организма. Накопленный экспериментальный материал позволяет использовать данные элективного курса «Композитные материалы в медицине» для повышения качества образования будущих медиков.

Список литературы

1. Таканаев А.А., Павловская Н.Е., Юшкова Е.И., Яроватая М.А., Лушников А.В. Исследование биологической активности N-галоидалкиламинов// Ученые записки Орловского государственного университета. № 7(63) 2014. С. 223-225.
2. Таканаев А.А., Халилов М.А., Юшкова Е.И., Яроватая М.А. Некоторые аспекты биотрансформации N-нитрозосоединений// Ученые записки Орловского государственного университета. № 4 (67) 2015. С. 405-406.
3. Таканаев А.А., Юшкова Е.И., Яроватая М.А. Изучение биотрансформации N-нитрозаминов как интерактивное приложение к лекционному курсу по биохимии// Ученые записки Орловского государственного университета. № 6 (69) 2015. С. 355-358.
4. Таканаев А.А., Юшкова Е.И., Яроватая М.А. Получение меченых униформ физиологически активных аминов и их производных как приложение к лабораторному практикуму по биохимии// Ученые записки Орловского государственного университета. № 1(70) 2016. С. 237-239.
5. Яроватая М.А., Таканаев А.А., Юшкова Е.И. Получение аминов, меченных по водороду – Н³, в качестве элективного курса «Практические методы биохимии»// Ученые записки Орловского государственного университета. № 1(70) 2016. С. 257-259.

6. Таканаев А.А, Яроватая М.А. Повышение эффективности процесса преподавания биохимии высокомолекулярных соединений в вузах медицинского профиля (на примерах биотрансформации полимерных производных некоторых гетероциклов)// Ученые записки Орловского государственного университета. № 2(75) 2017. С. 344-346.

7. Таканаев А.А, Яроватая М.А. Методы изучения биодеградации полимерных систем в рамках элективного курса «Композитные материалы в медицине» // Научный журнал «Ученые записки Орловского государственного университета», № 2 (79), 2018. С. 338-340.

8. Таканаев А.А, Яроватая М.А, Ярмолинская Т.М. Экспериментальные данные, полученные в рамках подготовки элективного курса «Композитные материалы в медицине»// Научный журнал «Ученые записки Орловского государственного университета», № 4 (85), 2019. С. 285-287.

УДК 539.19:541.124

Фадеев Г.Н., Богатов Н.А., Болдырев В.С.

*Московский государственный технический университет
им. Н.Э. Баумана,
Москва
gerfad@mail.ru*

Биологически активная система в поле низкочастотных воздействий

Приведены результаты исследования особенностей поведения системы, (состоящей из красителя метиленового голубого и аскорбиновой кислоты), каждый из компонентов которой является биохимически активным соединением. Вводимые в систему низкочастотные воздействия влияют на окислительно-восстановительное взаимодействие указанных компонентов. Определены параметры сонохимического процесса.

Ключевые слова: *окислительно-восстановительный процесс, метиленовый голубой, аскорбиновая кислота, низкочастотные воздействия.*

Fadeev G.N., Bogatov N.A., Boldyrev V.S.
*Bauman Moscow States Technical University
Moscow*

Biologically active system in the field of low-frequency impacts

The results of a study of the peculiarities of the behavior of a system (consisting of methylene blue dye and ascorbic acid), each of whose components is a biochemically active compound, are presented. Low-frequency influences introduced into the system affect the oxidation-reduction interaction of these components. The parameters of the sonochemical process were determined.

Key words: redox process, methylene blue, ascorbic acid, low-frequency effects.

Введение. Низкочастотные колебания отрицательно влияют на различные системы организма человека. Интервал наиболее опасных частот – инфразвуковой и начало звукового диапазона от 2 до 35 Гц. Механизм таких воздействий в настоящее время мало изучен. В представленной работе исследовано действие колебаний с частотой от 5 до 30 Гц и интенсивностью до 55 дБ на окислительно-восстановительное взаимодействие биохимически активных соединений: красителя метиленового голубого и аскорбиновой кислоты.

Для обратимого окисления или восстановления каждому из указанных веществ необходимо принять или, соответственно, отдать два атома водорода. Краситель из своего обычного состояния (Mg^+) при таком восстановлении превращается в свою бесцветную лейкоформу (LMg^0), а аскорбиновая кислота, окисляясь, из енольной формы (Ак) переходит в кетонную и становится дегидроаскорбиновой кислотой (ДАк). Если имеется подходящий акцептор (например, кислород воздуха), то краситель, отдавая водород акцептору, снова превращается в свою окисленную форму, а дегидроаскорбиновая кислота при определенных условиях способна к обратному восстановлению.

Система метиленовый голубой – аскорбиновая кислота позволяет проследить влияние поля низких частот и сопровождающих его явлений на взаимный окислительно-восстановительный процесс и выявить его особенности. Поглощая энергию акустических воздействий, подобные системы могут играть роль антидотов от неблагоприятного воздействия низкочастотных колебаний на организм человека. Это может служить ориентиром при разработке средств биохимической защиты от нелетального акустического оружия.

Экспериментальная часть и результаты измерений. При проведении исследований использовали метод абсорбционной спектроскопии. Экспериментальная установка и её параметры описаны в работе [1]. Использовали однолучевой спектрофотометр ПЭ-5400В со спектральным диапазоном 325-1000 нм. В данной работе представлены результаты, полученные для следующих частот: инфразвуковой диапазон – 7 Гц, граница инфразвук–звук – 15 Гц, начало звукового диапазона – 22 Гц. Сравнивали оптическую плотность растворов после действия колебаний и растворов, оставшихся без воздействия.

Первоначально определили влияние низкочастотных воздействий отдельно на состояние красителя и аскорбиновой кислоты. Определено, что равновесие между мономерной и димерной формами красителя устанавливается в течение 2-х минут и в последствии под влиянием колебаний не изменяется. Раствор аскорбиновой кислоты сохранял постоянным значение рН на протяжении всего времени воздействия колебаний. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали точечную оценку среднего, как принято в вариационной статистике. Использован метод прямых многократных измерений, доверительная вероятность 0,95.

Воздействие акустического поля на биологические объекты обусловлено совместным действием целого комплекса факторов. На протекание окислительно-восстановительного процесса в исследуемом растворе влияют, кроме вводимых низкочастотных колебаний, следующие:

- способность компонентов обратимо окисляться и восстанавливаться;
- присутствие кислорода, циркуляция которого зависит от частоты и амплитуды вводимых колебаний;
- кавитация, акустические течения и гидродинамические удары;
- тепловые эффекты, диффузия и т.п.

Роль каждого из указанных, а также других факторов в суммарном эффекте далеко не ясна. Нами в данной работе предпринята попытка оценить суммарный эффект низкочастотного воздействия. В таблице приведены экспериментальные данные.

Эффект оказался неожиданным. Изменение оптической плотности как мономерной, так и димерной форм метиленового голубого при реакции с аскорбиновой кислотой без низкочастотного воздействия меняется более значительно, чем при введении низкочастотных колебаний:

для мономера: $\Delta D_{0-20} = 0,149 - 0,121 = 0,028$,

для димера: $\Delta D_{0-20} = 0,112 - 0,085 = 0,027$.

В биохимически активных системах, исследованных нами ранее [1,2], действие акустических колебаний ускоряло процесс сонохимического превращения компонентов. Здесь же наблюдается «*эффект ингибирования*» окислительно-восстановительного процесса в поле низкочастотных акустических воздействий. При этом и мономерная, и димерная формы красителя метиленового голубого имеют одинаковое «отставание» скорости превращения.

Таблица. Оптическая плотность растворов без акустического воздействия и при введении колебаний ($\nu=15$ Гц, $W=3$ Вт/см², pH=5,6-5,8)

Время реакции, мин	Мономер		Димер	
	без акустического воздействия	при акустическом воздействии	без акустического воздействия	при акустическом воздействии
0	0,860	0,860	0,515	0,515
5	0,788	0,807	0,462	0,467
10	0,744	0,754	0,437	0,443
15	0,718	0,747	0,414	0,434
20	0,711	0,739	0,403	0,430
ΔD_{0-20}	0,149	0,121	0,112	0,085

При исследовании [3] клатратных соединений, образованных иодом с крахмалом (так называемый «синий иод»), был обнаружен *экстремальный характер действия инфразвуковых колебаний*. Близкие по составу, но различные по структуре, клатраты – амилоиодин и амилопектоиодин, – оказались *чувствительны к разным частотам*: амилоиодин – к инфразвуковым (12-15 Гц), амилопектоиодин – к частотам звукового диапазона (20-22 Гц). Результаты экспериментов, представленных в данной работе, показывают, что изучаемый окислительно-восстановительный процесс в системе «метиленовый голубой + аскорбиновая кислота» *не имеет ярко выраженного экстремума в интервале использованных частот*.

В рассматриваемой системе наблюдается своеобразный **«эффект ингибирования»** звукохимического процесса: при действии низкочастотных колебаний в растворе замедляется процесс восстановления красителя метиленового голубого. В первую очередь можно предположить влияние такого мощного окислителя как кислород. На это указывает изменение вида кинетической зависимости изменения оптической плотности для различных частот. Наибольшее различие соответствует частотам инфразвукового диапазона. Становится меньше на границе инфразвук-звук и практически исчезает при переходе к частотам звукового диапазона.

Можно предположить, что эффект торможения обусловлен изменением промежуточных стадий процесса. Дело в том, что не только аскорбиновая кислота способна восстанавливать молекулу метиленового голубого, но и сам краситель способен возвращать промежуточную полуокисленную *кетонную* форму аскорбиновой кислоты – монодегидроаскорбиновую кислоту – обратно в *енольную* ис-

ходную форму. Этот процесс естественным образом связан с изменением концентрации мономерной или димерной формами красителя. В пользу такого предположения свидетельствует влияние кислотности среды на скорость процесса.

Известно (см., например, [4,5]), что редокс-потенциал биохимически активных систем зависит от кислотности среды. В исследуемой нами реакции это сказывается на поведении аскорбиновой кислоты – в кислой среде она более сильный восстановитель. Аскорбиновая кислота более устойчива в кислой среде и малоустойчива в щелочной. Во всем интервале исследованных частот скорость процесса в кислой среде (при $pH=3$) более высокая, чем в щелочной ($pH=10,1$).

Заключение. Процесс дегидрирования кислоты катализируется катионами водорода, поэтому кислая среда увеличивает скорость окисления аскорбиновой кислоты. Среда, содержащая избыток протонов, в равной мере способствует звукохимическому превращению обеих компонентов окислительно-восстановительного процесса и красителя и кислоты. В щелочной среде сказывается неустойчивость аскорбиновой кислоты и продуктов её превращения.

Для красителя метиленового голубого играет роль особенность строения его димерной формы. Ассоциация форм Mg в димер (в виде структуры типа «сэндвич») возможна при участии Н-связи в трех точках: азота аминогрупп, азота и серы в тиазиновом кольце молекулы. В этих же точках при образовании лейкоформы присоединяется и атом водорода. У димера эти «активные центры» менее доступны, поэтому в щелочной среде преимущество получает мономер, как более «открытая» форма реагирующего компонента.

Выяснение механизма окислительно-восстановительного процесса является предметом нашего дальнейшего исследования.

Список литературы

1. *Болдырев В.С.* Действие низкочастотных колебаний на биохимически активные структуры: дис. ... канд. тех. наук. М., 2013. 118 с.
2. *Фадеев Г.Н., Болдырев В.С., Синкевич В.В.* Звукохимические превращения хелатных и клатратных структур в поле низкочастотных акустических воздействий // Доклады академии наук. 2015. Т. 462. № 4. С. 426-430. DOI: 10.7868/S0869565215160161
3. *Фадеев Г.Н.* Биологически активные системы – антитоды против низкочастотных воздействий. // Сб. докладов 2-й Международной научно-практической конференции «Спецсредства нелетального действия. Москва.23.04.2015». М.: «АлексВ», -С. 50-51.

4. Ершов Ю. А., Хачатурян М. А., Семенова Н.С., Альков С. В. Инфразвуковая обработка фармацевтических дисперсных материалов. Биомедицинская радиоэлектроника, 2017, № 9, -С.40 -43.

5. Gorshkova V.M., Savchenko S.V. Potential use of ultrasound for subcutaneous delivery of anesthetics//Biomedical Engineering.2013.v.47. №1.p.36-38. DOI:10.1007/s10527-013-9329-6.

УДК 616-006.04+615.849.1

*Шевченко О.В.,¹ Тананаев И.Г.,² Медков М.А.,³ Апанасевич В.И.,⁴
Плехова Н.Г.,⁵ Юдаков А.А.,⁶ Лукьянов П.А.⁷*

*Академический департамент Ядерных технологий Дальневосточного
федерального университета^{1,2}*

*Лаборатория молекулярной фармакологии и биомедицины
Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
ДВО РАН¹,*

*Инженерно-технологический центр Института химии ДВО РАН¹,
Лаборатория переработки минерального сырья Института химии
ДВО РАН³,*

*Институт хирургии Тихоокеанского медицинского университета⁴,
Центральная научно-исследовательская лаборатория Тихоокеанского
государственного медицинского университета⁵, Владивосток, Россия*

*Кафедра нефтегазового дела и нефтехимии Инженерной школы
Дальневосточного федерального университета⁶, Владивосток, Россия,
Институт химии ДВО РАН⁶, Владивосток, Россия,*

*Отдел молекулярной иммунологии Тихоокеанского института
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН⁷,
Владивосток, Россия*

*Itarakovaolga@gmail.com, geokhi@mail.ru², medkov@ich.dvo.ru³,
oncolog222@gmail.com⁴, ⁵pl_nat@hotmail.com,
etcih@mail.ru⁶, paluk@mail.ru⁷*

**Разработка молекулярных комплексов хлорина Е6 с европием,
способных к генерации активных форм кислорода с перспективой
применения в области радиофотодинамической терапии**

Разработаны методы синтеза бинарных комплексов Хлорина Е6 с европием, а также молекулярных конъюгатов на основе полиэтиленimina для терапии глубоких опухолей. Показана их хорошая биосовместимость и эффективность в генерации активных форм кислорода в экспериментах ex vivo.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор; активные формы кислорода; тормозное излучение; фотодинамическая терапия; радиотерапия; онкология.

*Shevchenko O.V.¹, Tananaev I.G.², Medkov M.A.³, Apanasevich V.I.⁴,
Plekhova N.G.⁵, Yudakov A.A.⁶, Lukyanov P.A.⁷
Academic Department of Nuclear Technology of Far Eastern Federal^{1,2}
University, Laboratory of Molecular Pharmacology and Biomedicine Pacific¹
Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Engineering and Technology
Center of the Institute of Chemistry FEB RAS¹, Vladivostok, Russia
Laboratory for Processing Mineral Raw Materials Institute of Chemistry
FEB RAS³, Vladivostok, Russia
Institute of Surgery Pacific State Medical University⁴, Vladivostok, Russia
Central Research Laboratory of the Pacific State Medical University⁵,
Vladivostok, Russia
Department of Oil and Gas Business and Petrochemistry⁶, Engineering School
of the Far Eastern Federal University, Institute of Chemistry FEB RAS,
Vladivostok, Russia
Department of Molecular Immunology, G.B. Elyakov Pacific Institute of
Bioorganic Chemistry FEB RAS⁷, Vladivostok, Russia*

Development of molecular complexes of Chlorin e6 with europium capable to generating of reactive oxygen species with the prospect of using in the field of radiophotodynamic therapy

Methods have been developed for the synthesis of binary complexes of Chlorin E6 with europium, as well as molecular conjugates based on polyethyleneimine for the treatment of deep tumors. Their good biocompatibility and efficiency in the generation of reactive oxygen species in ex vivo experiments have been shown.

Key words: *photosensitizer; reactive oxygen species; bremsstrahlung; photodynamic therapy; radiotherapy; oncology.*

Онкологические заболевания включены в группу наиболее острых медико-социальных проблем наряду с туберкулезом, гепатитом В, С, ВИЧ и другими заболеваниями, что отражено в постановлении Правительства РФ № 715 от 1 декабря 2004 года [1]. В настоящее время наблюдается устойчивая тенденция роста онкологических заболеваний во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения в России этот показатель ежегодно увеличивается на 1,5%. Согласно информации Минздрава РФ, в 2019 году в России выявлено 640,4 тыс. случаев злокачественных новообразований, что является рекордным показателем. Он на 2,5% превышает результат 2018 года. Общий уровень заболеваемости составил 436,3 случая на 100 тыс. населения [2]. Смертность от онкологических заболеваний сегодня на-

ходится на втором месте после сердечно-сосудистых. Проблема роста онкологических заболеваний стала мировой. Для того, чтобы снизить тенденцию к росту и развитию заболеваемости и смертности, необходимо разработать как методы ранней диагностики, так и эффективного лечения. В России развитие высокотехнологичной медицинской помощи поддерживается Правительством и входит в список приоритетных направлений научно-технологического развития Российской Федерации [3].

На сегодняшний день общепринятыми методами лечения являются хирургическая резекция, химиотерапия, лучевая терапия и другие, более современные методы. Одним из стремительно развивающихся методов лечения является фотодинамическая терапия (ФДТ), основанная на способности некоторых веществ вступать в фотохимические реакции и генерировать активные формы кислорода, разрушающие опухолевые клетки.

В начале XX века ФДТ применялась для лечения кожных заболеваний и разного рода инфекций [4]. По сравнению с обычной химиотерапией и лучевой терапией метод привлекателен своей неинвазивностью, безопасностью и избирательностью [5]. Высокая селективность ФДТ обусловлена способностью фотосенсибилизаторов (ФС) к накоплению в тканях опухоли и возможностью более точного облучения лазером зоны поражения.

За прошедшее столетие были синтезированы и исследованы различные органические и неорганические ФС, некоторые из них уже прошли клинические испытания. Разработаны и адаптированы новые источники света и оптические приборы для ФДТ.

Несмотря на прогресс, ФДТ все еще не является приоритетным передовым методом лечения рака, в большинстве своем, из-за ограниченной глубины проникновения света в ткани опухоли. Для ультрафиолетового (УФ) и синего света ($\lambda = 400\text{--}450$ нм) эффективная глубина проникновения составляет около 50–100 мкм. За счет поглощения света меланином и гемоглобином глубина проникновения зеленого света ($\lambda = 500\text{--}550$ нм) составляет несколько сотен микрометров. Что касается красного и ближнего инфракрасного (NIR) света ($\lambda = 600\text{--}1350$ нм), то глубина проникновения является наибольшей и обычно составляет 1–3 мм (Рис. 1) [6, 7].

Однако это подразумевает проведение ФДТ только поверхностных опухолей. Наша работа ориентирована на разработку метода радиофотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизатора Фотодитазина (Хлорина Е6) и ионов европия (хелатор ионов европия — диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА), способных возбуж-

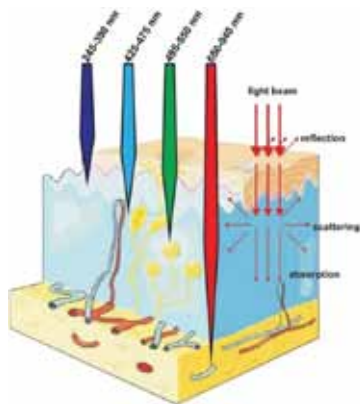


Рис. 1. Схематическое изображение проникновения света в ткани [6, 7]

даться в ходе радиотерапии и передавать энергию возбуждения фотосенсибилизатору. Кроме того, мы модифицируем эти молекулярные комплексы, например, фолиевой кислотой (ФА), рецепторы которой высоко экспрессированы на онкоклетках. В результате проведения терапии с использованием этих препаратов происходит генерация активных форм кислорода, разрушающих злокачественные клетки.

Для синтеза молекулярных комплексов нами используется ФС «Фотодитазин», а именно его действующее вещество – Хлорин е6 (рис. 2).

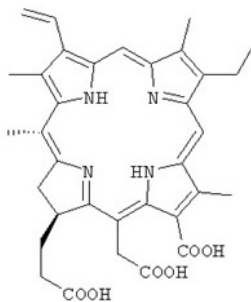


Рис. 2. Структура Хлорина е6

Фотодитазин является клинически одобренным в России препаратом. Определены спектральные характеристики Хлорина е6: основные максимумы поглощения расположены в области 405 и 660 нм (рис. 3), что полностью согласуется с литературными данными [8] (см. рис. 3).

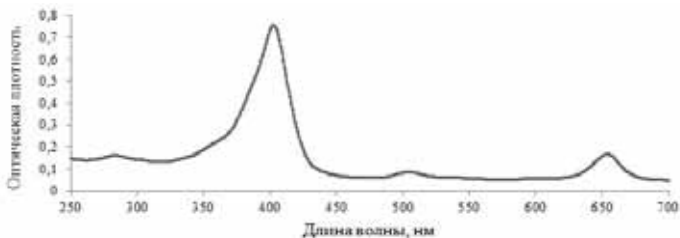


Рис. 3. Спектр поглощения Хлорина е6

Синтезирован бинарный комплекс Фотодитазина с европием, в котором на одну молекулу европия приходится 4 молекулы хлорина Е6. Полученный бинарный комплекс обладает низкой аффинностью компонентов друг к другу и способен легко диссоциировать в биологических средах: константа связывания Фотодитазина с ионами европия составляет только $4,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ [9]. В связи с этим синтезированы более стабильные конъюгаты на основе высокомолекулярного полиэтиленimina (PEI) с модулями фотосенсибилизатора Хлорина Е6, хелатора ионов европия (DTPA) и фолиевой кислоты (FA) для векторной доставки препарата опухолевым клеткам. Присутствие Хлорина е6 в структурах определяли с помощью оптических и флуоресцентных параметров. Кроме того, молекула Хлорина Е6 имеет два асимметрических атома углерода, и ее специфический угол оптического вращения $[\alpha]_D^{25} = +0.029$ (С 0,05 мг/мл, H_2O), который можно также использовать при характеристике финальных конъюгатов.

Для определения функциональности препаратов, то есть способности к генерации активных форм кислорода, молекулярные комплексы подвергались жесткому УФ-облучению в течение 30 минут. Результаты представлены на рис. 4.



Рис. 4. Генерация активных форм кислорода конъюгатами при УФ-облучении

Как видно из рис. 4, эффективность конъюгата PEI-E6-DTPA-FA-Eu при концентрации хлорина E6 1,25 мкг/мл в 9,2 раза выше, нежели у бинарного комплекса Eu-E6.

На следующем этапе молекулярные комплексы исследовали на способность к генерации АФК при воздействии гамма-излучения.

Из рис. 5а видно, что бинарный комплекс гораздо более интенсивно генерирует активные формы кислорода при воздействии тормозным излучением, нежели Хлорин е6 один. Включение ионов европия в структуру конъюгат PEI-E6-DTPA-FA также усиливает способность к генерации активных форм кислорода (рис. 5б).

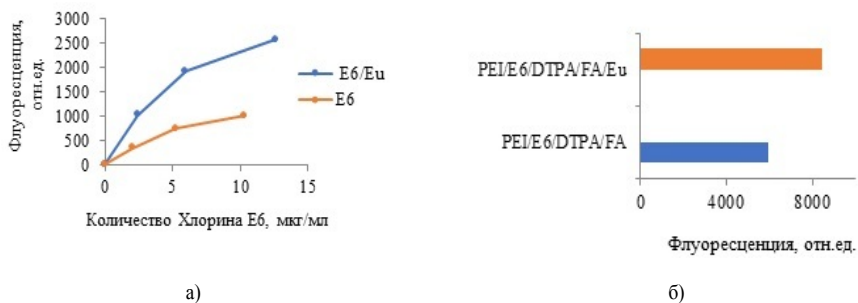


Рис. 5. Генерация АФК при воздействии тормозного излучения на: а) бинарный комплекс и Хлорин е6 б) PEI-E6-DTPA-FA и PEI-E6-DTPA-FA-Eu при концентрации 1 мкг/мл

При выборе дозы излучения максимальная эффективность достигалась при воздействии 2 Гр. Большие значения (3-6 Гр) приводили к снижению эффективности, возможно в связи с деструкцией фотосенсибилизатора при жестком облучении.

Все исследованные препараты не токсичны в дозе 200 мкг/мл и ниже для клеток теплокровных [9]. Это говорит об их хорошей биосовместимости и возможности на их основе разработки препаратов для лечения злокачественных новообразований.

Таким образом, синтезированы комплексы и конъюгаты на основе Хлорина е6, эффективно генерирующие активные формы кислорода при воздействии гамма-излучением. Мультифункциональные конъюгаты содержат модули фотосенсибилизатора, хелатора ионов европия и фолиевой кислоты, как векторной молекулы, для доставки к онкоклеткам, которые могут быть эффективно использованы для таргетной радиофотодинамической терапии онкопатологий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-90185.

Список литературы

1. Российская Федерация: Правительство. Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, предоставляющих опасность для окружающих: постановление от 1 декабря 2004 г., N 715 // Бюллетень трудового и социального законодательства Российской Федерации. 2004. №. 12. С. 6
2. Рак (онкологические заболевания) [Электронный ресурс] // ZDRAV.EXPERT: Рак (онкологические заболевания). URL: [http://zdrav.expert/index.php/Статья:Рак_\(онкологические_заболевания\)](http://zdrav.expert/index.php/Статья:Рак_(онкологические_заболевания)) (дата обращения: 14.09.2020)
3. Горбунов С. Н., Никонов Е. Л. Оказание высокотехнологичной медицинской помощи населению Российской Федерации: анализ нормативных документов // Вестник Росздравнадзора. 2008. №. 2. С. 30-38.
4. Странадко Е. Ф. Основные этапы развития и современное состояние фотодинамической терапии в России // Лазерная медицина. 2012. Т. 16. №. 2. С. 4-14
5. Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey RK. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy // Chemical Society Reviews. 2011. Т. 40. №. 1. С. 340-362
6. Hu J.J., Lei Q., Zhang X.Z. Recent advances in photonanomedicines for enhanced cancer photodynamic therapy // Progress in Materials Science. 2020. С. 100685
7. Photodynamic therapy of cancer: an update / P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, J. Golab // CA: a cancer journal for clinicians. 2011. Т. 61. №. 4. С. 250-281
8. Химико-фармацевтическая стандартизация фотодитазина / Л.Г. Гатинская, А.П. Будько, Н.А. Дмитричева, Е.В. Игнатьева, Б.С. Кикоть, Г.В. Пономарева, И.В. Ярцева // Российский биотерапевтический журнал. 2004. Т. 3. №. 2. С. 49.
9. Молекулярные комплексы хлорина Е6 и европия для радиофотодинамической терапии / О. В. Шевченко, Н.Р. Панкратов, А.П. Фильштейн, М.А. Медков, В.И. Апанасевич, И.Г. Тананасев, П.А. Лукьянов // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2020. №. 2. С. 103-107.

УДК 576.311

*Шемарова И.В.¹, Кузнецов В.А.², Лавлинская М.С.²,
Калмыкова Н.В.³, Щербанюк А.В.³, Степанова Н.П.⁴*
ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова Российской академии наук¹, Министерство науки
и высшего образования РФ, Санкт-Петербург;
irina-shemarova@yandex.ru
ФГБУ Воронежский государственный университет², Министерство
науки и высшего образования РФ, Воронеж
ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины
им. А.М. Никифорова МЧС России³, Санкт-Петербург
ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный
медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России⁴,
Санкт-Петербург

**Определение цитотоксичности и биологической активности
наночастиц сукцината хитозана на клетках миеломной линии
RPMI8226 и фибробластах кожи человека**

В работе приведены экспериментальные данные по определению цитотоксичности и биологической активности наночастиц сукцината хитозана, выявляемой с использованием двух типов клеток — нативных фибробластов кожи человека и трансформированных миеломных клеток линии RPMI8226.

Ключевые слова: наночастицы сукцината хитозана, дермальные фибробласты, RPMI8226.

*Shemarova I.V.¹, Kuznetsov V.A.², Lavlinsky M.S.², Kalmykova N.V.³,
Shcherbaniuk A.V.³, Stepanova N.P.⁴*
FSBEC I. M. Sechenov Institute of evolutionary physiology and biochemistry¹,
Russian academy of sciences, Ministry of science and higher education of the
RF, St.Petersburg;
irina-shemarova@yandex.ru
FSBE Voronezh state University², Ministry of science and higher education of
the RF, Voronezh
FSBI The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine
(NRCERM, EMERCOM of Russia)³,
FSBE North-Western state medical University⁴
named after I. I. Mechnikov, St.Petersburg

**Detection of cytotoxicity and biological activity of chitosan succinate
nanoparticles on myeloma line RPMI8226 cells and**

The paper presents experimental data on the detection of cytotoxicity and biological activity of chitosan succinate nanoparticles detected using two types

of cells – normal human skin fibroblasts and transformed myeloma cell line RPMI8226.

Key words: *nanoparticles of chitosan succinate, viability, dermal fibroblasts, RPMI8226.*

Наномедицина и нанотехнология являются новыми областями науки, и существует немного экспериментальных данных о терапевтическом влиянии нанолечарств на организм человека [1-3]. Тем не менее, уже сейчас появляются препараты, в составе которых имеются полимерные биodeградируемые наноматериалы, облегчающие направленную доставку лекарственного вещества к клеткам-мишеням [4]. Среди материалов, имеющих перспективу для дальнейшей разработки в качестве наноносителей лекарственных веществ, рассматривается и хитозан, поскольку он нетоксичен (одобрен FDA для применения в лечебных целях), имеет соответствующую полимерную структуру, способную к биodeградации, высокую химическую реакционную способность, а также электрический заряд, усиливающий процессы адсорбции лекарственных веществ на наночастицах [5, 6].

Важным свойством наноматериалов, в том числе наночастиц (НЧ) хитозана, является их способность проникать через барьеры организма, что позволяет использовать наночастицы в качестве пассивных транспортеров лекарственных веществ в клетки-мишени и даже определенные клеточные компартменты при различных заболеваниях, среди которых наиболее значимыми являются онкологические заболевания и болезни сердечно-сосудистой системы [1, 2, 6-9].

В связи с перспективой использования наночастиц в медицине мы исследовали *in vitro* ряд наночастиц хитозана и сукцинат-хитозана, имеющих различную молекулярную массу, 73, 155 и 600 кД. Действующее вещество изучаемого нанокомплекса, сукцинат, является энергетическим субстратом и входит в состав митохондриального дыхательного комплекса II, необходимого для клеточного дыхания и процессов окислительного фосфорилирования. Кроме того, сукцинат-хитозан обладает большей растворимостью при нейтральных значениях pH, чем хитозан, и является более доступной для клеток транспортной формой. Также известно, что для наночастиц хитозана и его производных такие свойства как биodeградация, биодоступность и хелатирующая способность зависят от молекулярной массы. В нашем исследовании мы поставили задачу оценить цитотоксичность наночастиц хитозана и сукцината хитозана различной молекулярной массы по отношению к нормальным и трансформированным клеткам.

В первой серии экспериментов определяли цитотоксичность НЧ низко- и высокомолекулярных фракций хитозана и сукцината хитозана. При этом использовали НЧ хитозана 155 кД и сукцината хитозана 73, 155 и 600 кД. Влияние образцов НЧ низко- и высокомолекулярных фракций хитозана и сукцината хитозана на жизнеспособность клеток проверяли на двух линиях — адгезионной культуре нормальных фибробластов кожи человека и суспензионной культуре клеток миеломной линии RPMI8226. Жизнеспособность клеток оценивали по их метаболической активности МТТ-тестом с использованием тетразолиевого красителя МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) [10]. МТТ является субстратом для митохондриальных дегидрогеназ, которые в ферментативно-активных живых клетках переводят растворимый тетразолий в нерастворимые окрашенные кристаллы формазана.

Для культивирования фибробластов и клеток миеломной линии RPMI8226 использовали среду ДМЕМ и RPMI1640, соответственно, с 10% эмбриональной сывороткой коров (все реактивы производства «Биолот»). За сутки до эксперимента клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 3×10^4 клеток/лунку для фибробластов и 4×10^4 клеток/лунку для RPMI8226. Через 24 ч в среду культивирования вносили образцы НЧ (10 мкл/лунку), предварительно разведенных в полной ростовой среде так, чтобы конечная концентрация составила 50, 100, 200 мкг/мл. Одновременно с опытом ставили два контроля: лунки с клетками без НЧ в ростовой среде (контр) и лунки с полной ростовой средой с НЧ без клеток (на рис. не показан). Через 24 ч культивирования клеточных культур с НЧ определяли метаболическую активность клеток МТТ-тестом. Для этого в лунки вносили раствор МТТ (5 мг/мл, объемная доля 10%) и инкубировали в течение 4 часов при 37°C в CO₂-инкубаторе. После удаления ростовой среды кристаллы формазана растворяли добавлением 50 мкл ДМСО (Sigma, США) в каждую лунку и инкубировали 15 мин. Оптическую плотность (OD) растворов определяли на планшетном спектрофотометре при основной длине волны 540 нм и опорной длине волны 690 нм. По предварительно построенной калибровочной кривой определяли соответствие показателей OD количеству клеток. Представлены результаты трех независимых экспериментов, от трех до восьми повторностей в каждом.

Исследования показали, что тестируемые образцы НЧ в диапазоне концентраций 50-200 мкг/мл не токсичны для линии нормальных фибробластов кожи человека (рис. 1).

Фибробласты кожи человека

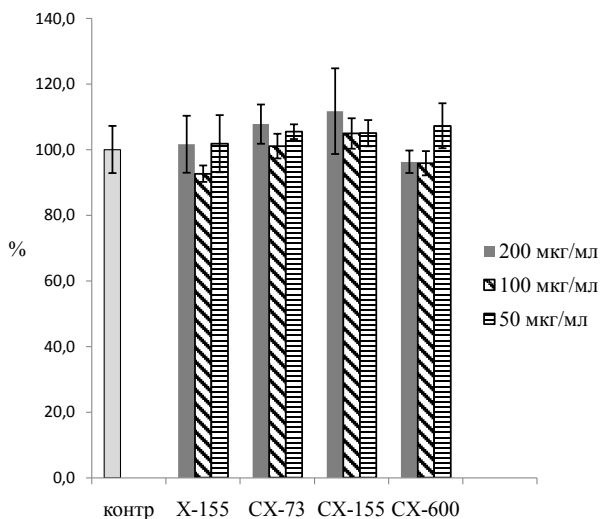


Рис. 1. Оценка жизнеспособности фибробластов кожи человека через 24-ч культивирования с НЧ хитозана (X) и сукцинат-хитозана (CX) в разных концентрациях (50, 100, 200 мкг/мл). По оси абсцисс – варианты НЧ; по оси ординат – относительное количество клеток по сравнению с количеством клеток в контроле, %. На гистограмме представлены средние значения и стандартные отклонения (Mean + SD)

Для клеток линии RPMI8226 было показано, что тестируемые образцы НЧ в диапазоне концентраций от 50 до 200 мкг/мл также не токсичны (рис. 2). Однако в биологическом действии НЧ различной молекулярной массы выявлены различия: высокомолекулярные образцы НЧ сукцината хитозана (CX-600, CX155), по сравнению с контрольным вариантом, достоверно увеличивают показатели метаболической активности клеток.

Полученную разницу в ответе клеток на присутствие высокомолекулярных НЧ сукцината хитозана можно объяснить тем фактом, что клетки постоянной трансформированной миеломной линии RPMI8226 по метаболическим и пролиферативным показателям более активны по сравнению с нормальными фибробластами кожи, и, соответственно, быстрее отвечают на изменение внешних факторов. Кроме того, высокомолекулярные наноконплексы плохо растворимы в среде культивирования и образуют агрегаты на дне лунки, наблюдаемые под микроскопом. По-видимому, эти агрегаты дольше удерживаются

Клетки линии RPMI8226

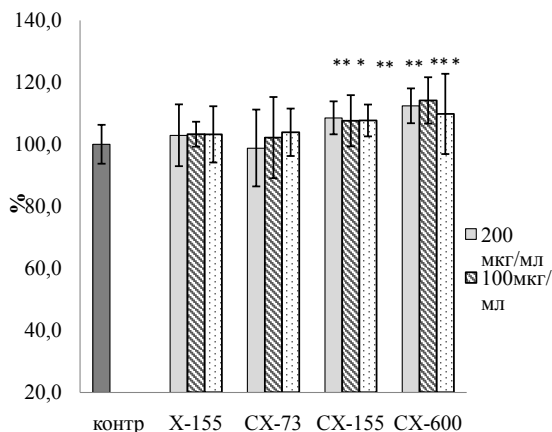


Рис. 2. Оценка жизнеспособности клеток линии RPMI8226 через 24 ч культивирования с НЧ хитозана (X) и сукцинат-хитозана (CX) в разных концентрациях (50, 100, 200 мкг/мл). По оси абсцисс – варианты НЧ; по оси ординат – относительное количество клеток по сравнению с количеством клеток в контроле, %. На гистограмме представлены средние значения и стандартные отклонения (Mean+SD).

Отличие от контроля достоверно ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

живают заключенные в них молекулы сукцината, что пролонгирует их специфическое биологическое действие (по аналогии с другими формами труднорастворимых лекарственных веществ), а также способствуют адгезии опухолевых клеток, что, в свою очередь, может приводить к увеличению их жизнеспособности.

Во второй серии экспериментов определяли влияние НЧ высокомолекулярной фракции сукцината хитозана (CX-600) на жизнеспособность RPMI8226 при высокой плотности посева. Схема эксперимента была аналогичной первой серии, но было увеличено время культивирования (до 48 ч) и была увеличена плотность посева клеток RPMI822 с 4×10^4 до 7×10^4 клеток/лунку. Плотность посева была приближена к максимальной плотности для суспензионной культуры, что было необходимо для перевода клеток в состояние пролиферативного покоя (G_0). Через 24ч после посева клеток в лунки 96-луночного планшета в среду культивирования вносили образцы исследуемых НЧ (10 мкл/лунку, конечная концентрация 200 мкг/мл).

Постоянная клеточная линия RPMI8226 через 48 ч культивирования оказалась в условиях повышенной плотности клеток, приводящей к недостатку питательных веществ. По-видимому, по этой причине, отмечается снижение показателей жизнеспособности клеток со 100% до 80% по сравнению с аналогичными показателями через 24 ч. В этих условиях наличие НЧ (СХ-600) в среде культивирования способствует увеличению жизнеспособности клеток – с 80 до 92,5% ($p < 0,05$, рис. 3).

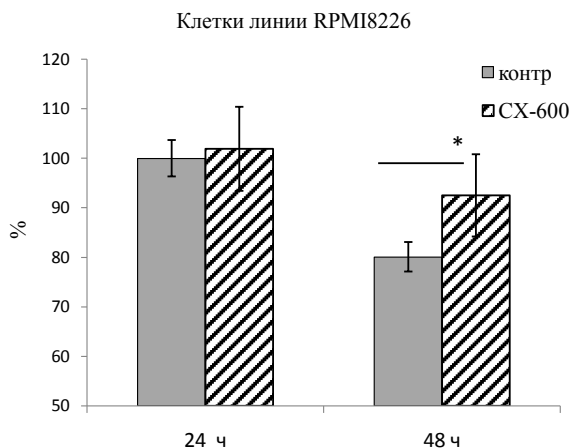


Рис. 3. Оценка жизнеспособности клеток линии RPMI8226 через 24 – 48 ч культивирования с НЧ СХ-600. По оси абсцисс – время культивирования клеток (ч); по оси ординат – относительное количество клеток по сравнению с количеством клеток в контроле, %. На гистограмме представлены средние значения и стандартные отклонения (Mean + SD). *- отличие от контроля достоверно, $p < 0,05$

Таким образом, с учетом механизма действия тетразолиевого красителя МТТ на клетки, полученные данные свидетельствуют о том, что НЧ сукцината хитозана (СХ-600) обладают биологической активностью и повышают метаболическую активность/выживаемость плотнорастущих клеток. Эти результаты важны для понимания роли сукцината в повышении адаптационных возможностей клеток и открывают перспективы для создания на основе НЧ сукцината хитозана лекарственных средств в метаболической терапии заболеваний, связанных с энергетическим обменом. Однако, возможные механизмы действия НЧ и их возможности использования в качестве носителей лекарственных веществ, требуют дальнейшего исследования.

Работа выполнена с использованием средств государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290142-9.

Список литературы

1. Qiu J., Cai G., Liu X. $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor specific peptide modified, salvianolic acid B and panax notoginsenoside loaded nanomedicine for the combination therapy of acute myocardial ischemia // *Biomed Pharmacother.* 2017. V. 96. P. 1418-1426.
2. Oduk Y., Zhu W., Kannappan R. VEGF nanoparticles repair the heart after myocardial infarction // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2018. V. 314. H278-H284.
3. Ding D., Zhu Q., Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics // *Mater. Sci Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2018. V. 92. P. 1041-1060.
4. Nanoparticulate delivery system for a secretoneurin derivative induces angiogenesis in a hind limb ischemia model / Albrecht-Schgoer K., Barthelmes J., Schgoer W., Theurl M., Nardin I., Lener D., Gutmann C., Dünnhaupt S., Bernkop-Schnürch A., Kirchmair R. // *J. Control. Release.* 2017. V. 250. P. 1-8.
5. Chitosan-Based Hydrogel Microparticles for Treatment of Carcinoma in a Rabbit VX2 Liver Tumor Model / Hwang H., Kim H.S., Kwon J., Oh P., Park H., Lim S., Sohn M., Jeong H. // *J. Vasc. Interv. Radiol.* 2018. V. 29. P. 575-583.
6. Zhang Y.Q., Shen Y., Liao M.M. Galactosylated chitosan triptolide nanoparticles for overcoming hepatocellular carcinoma: Enhanced therapeutic efficacy, low toxicity, and validated network regulatory mechanisms // *Nanomedicine.* 2018. V.15. P. 86-97.
7. Poovaiah N., Davoudi Z., Peng H. Treatment of neurodegenerative disorders through the blood-brain barrier using nanocarriers // *Nanoscale.* 2018. V. 10. P. 16962-16983.
8. Ong S.B., Lu S., Katwadi K. Nanoparticle delivery of mitoprotective agents to target ischemic heart disease // *Future Cardiol.* 2017. V. 13. P. 195-198.
9. Amini M.A., Abbasi A.Z., Cai P. Combining Tumor Microenvironment Modulating Nanoparticles with Doxorubicin to Enhance Chemotherapeutic Efficacy and Boost Antitumor Immunity // *J. Natl. Cancer Inst.* 2019. V. 111. № 4. P. 399-408.
10. Mossmann T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55-63.

УДК.541.49.183:546.562.723:547.854.5

Шлейкин А.Г.¹, Чухно А.С.², Шерстнев В.В.¹, Романенко М.С.²
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Университет ИТМО»¹
Научно-образовательный центр химического инжиниринга
и биотехнологий, доцент факультета пищевых
биотехнологий и инженерии, Россия, Санкт-Петербург
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова,
кафедра биологической и общей химии², Россия, Санкт-Петербург
shleikin@yandex.ru; alex-chuhno@yandex.ru; friend-rus77@yandex.ru;
marina.romanenko.2001@mail.ru

Кинетика гелеобразования белков (на модельной системе – бычий сывороточный альбумин)

В работе показана возможность получения губчатых альбуминовых криогелей и принципиальная возможность их использования в качестве биodeградируемой основы для различных биологически активных веществ (антибиотиков), или в качестве матрицы для выращивания культур клеток, с возможностью дальнейшей трансплантации в живой организм.

Ключевые слова: гелеобразование белков, биodeградируемая матрица, субстрат для цитологических культур.

Shleikin A.G.¹, Chukhno A.S.², Sherstnev V.V.¹, Romanenko M.S.²
ITMO University¹, Educational Center for Chemical Engineering and
Biotechnology, Associate Professor of the Faculty of Food Biotechnology and
Engineering, Russia, St. Petersburg
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov²,
Department of Biological and General Chemistry, Russia, St. Petersburg

Kinetics of protein gelation (on the model system – Bovine Serum Albumin)

This research demonstrates the possibility of obtaining albumin cryogels and shows the principal possibility of using spongy BSA cryogels as a biodegradable base for various biologically active substances (antibiotics), or as a matrix for the cultivation of cytological cultures, with the possibility of further transplantation into a living organism.

Key words: gelation of proteins, biodegradable matrix, substrate for cytological cultures.

Актуальность темы. В нашей работе рассматривается сопоставление кинетики тепловой и индуцированной агрегации модельного

белка (бычьего сывороточного альбумина). Показан метод криотропного гелеобразования в неглубоко замороженной системе.

Агрегация белков протекает как *in vivo*, — в живых организмах, так и *in vitro*, — в искусственно созданных лабораторных условиях; в результате воздействия стрессовых факторов, нарушающих нативную структуру белка. К таким воздействиям относятся повышение температуры, изменение рН, механическое воздействие (например, при перемешивании или встряхивании), циклы замораживания и оттаивания, — в результате чего происходит денатурация — разрушение четвертичной, третичной и вторичной структуры белка.

Агрегацию белков вызывают те же факторы, действующие и при денатурации белков. Ковалентно связанные агрегаты могут формироваться за счет дисульфидных связей, образуемых свободными тиоловыми группами или недисульфидными сшивками, например, путем образования дитиозинов между молекулами белка. Ковалентные дисульфидные связи обеспечивают образование поперечных сшивок, значительно более прочных, чем гидрофобные взаимодействия и водородные связи, которые, как полагают, обеспечивают первоначальное скручивание молекулы белка. Дисульфидная поперечная сшивка делает относительно постоянным то расположение пептидных цепей, которое первоначально образовалось за счет более слабых связывающих сил. Биохимическая важность дисульфидной связи определяется уникальностью природы системы тиол — дисульфид, в которой связь может образовываться и разрываться посредством дисульфидного обмена.

По данным [1-4], полученных методом динамического светорассеяния: в случае тепловой агрегации БСА высокорекреационноспособная развернутая форма белка полностью переходит в агрегированное состояние на момент завершения денатурации. Полученные агрегаты называются первичными агрегатами. При 65 °С часть низкорекреационноспособной развернутой формы белка может вовлекаться в процесс агрегации путем присоединения к агрегатам большого размера. Далее, предполагается, что низкорекреационноспособная форма присоединяется к первичным агрегатам и этот процесс завершается формированием вторичных агрегатов после полного исчезновения низкорекреационноспособной формы. Формирование вторичных агрегатов может рассматриваться как гетерогенная нуклеация. В этом случае ядро формируется на поверхности первичного агрегата, и рост агрегата продолжается в результате присоединения развернутых мономеров к гетерогенному ядру [1-4].

Гетерогенная нуклеация может объяснить факт разделения во времени стадий формирования первичных и вторичных агрегатов. Последние данные литературы подтверждают важность таких процессов, как последовательное присоединение мономеров к агрегатам и взаимодействие агрегатов друг с другом при тепловой агрегации БСА при 60–75 °С. Первичные агрегаты могут выступать как инициаторы агрегации при дальнейшем росте агрегатов [1–4].

Основной белок сыворотки крови, альбумин (в частности, бычий сывороточный альбумин, или БСА) может служить удобным объектом для получения на его основе макропористых гелей, в том числе и медицинского назначения, однако криотропное гелеобразование БСА еще недостаточно изучено.

Практическая значимость. В данной работе продемонстрирована возможность получения БСА-криогелей, пористое строение которых открывает возможность их использования в качестве носителя различных биологически активных веществ; в качестве основы биодеградируемых депо-форм для различных антибактериальных препаратов для химиотерапии инфицированных ран.

Благодаря применению биодеградируемых депо-форм лекарственных препаратов, вводимых в полости организма (ректально, вагинально, орофарингеально), или на поверхность открытой раны (язвы), действующее лекарственное вещество высвобождается из полимерного материала за счет его набухания и «растворения» (биодеградации) и поступает непосредственно к очагу поражения, — направленная доставка, что способствует лучшему терапевтическому эффекту. Поэтому разработка таких биосовместимых нетоксичных полимерных материалов, обеспечивающих максимально направленный, пролонгированный транспорт лекарственного вещества с высвобождением непосредственно в очаге поражения, остается очень важной задачей, не менее важной, чем производство самого действующего лекарственного вещества.

Бычий сывороточный альбумин (сокращённо БСА, англ. Bovine Serum Albumin, BSA) — одноцепочечный белок плазмы крови крупного рогатого скота с молекулярной массой 69 КДа, составляет примерно 60–70% белка плазмы крови. По форме, он представляет собой глобулу в виде сплюснутого эллипсоида вращения с полуосями 17 на 42 ангстрем, состоящую из 607 аминокислотных остатков. Аминокислотная последовательность в БСА на 76% гомологична последовательности сывороточного альбумина человека. В процессе замораживания-оттаивания происходят сложные физические и химические процессы, включая образование поверхностей раздела между

льдом и жидкостью, адсорбция и криоконцентрация белков и солей буфера, изменение рН раствора в связи с кристаллизацией компонентов буфера. Эти изменения могут индуцировать денатурацию и агрегацию белка [5-9].

Хаотропные агенты, например мочевины, разворачивают белковые структуры путем разрушения внутримолекулярных связей.

Зная состав БСА, – его аминокислотная последовательность включает 35 остатков Цистеина, 34 из которых формируют 17 дисульфидных мостов, стабилизирующих глобулу; и один остаток Цистеина, несущий свободную тиольную группу, – можно рассчитать количественное соотношение компонентов реакционной смеси. Родионов И. А. в своей кандидатской диссертации [4], ссылаясь на работу Н.В. Константиновой и В.И. Лозинского [10], при синтезе криогелей на основе БСА предложил использовать для более полного разворачивания альбуминовых глобул, возможно требуемого для гелеобразования, – цистеин, – который расщепляет внутримолекулярные дисульфидные связи в макромолекулах белка, в особенности в присутствии денатурирующих агентов [11]. Родионов И. А. в своей работе использовал цистеин, мы в нашей работе применили ацетилцистеин, – производное аминокислоты цистеина, он тоже способен разрывать дисульфидные связи в макромолекулах БСА и вызывать деполимеризацию, способствуя более полному разворачиванию полипептидных цепей, а также применили другую методику подготовки реагентов. Присутствие в системе денатурирующего агента, т.е. мочевины, также способствует разворачиванию макромолекул БСА, таким образом, диффузия ацетилцистеина к внутримолекулярным SS-мостам внутри глобулы БСА проходит легче.

Для расчета компонентов реакционной смеси мы исходили из состава молекулы БСА. Молярная концентрация БСА в его растворе с концентрацией 100 мг/мл $\sim 1,44$ ммоль/л, а общая концентрация остатков Цистеина в нем составляет около 50,4 ммоль/л, концентрация SS-мостов $\sim 25,2$ ммоль/л, а содержание свободных SH-групп составляет примерно 1,4 ммоль/л, соответственно [4, 12, 13].

Следовательно, для приготовления исходного раствора для синтеза БСА-криогеля, молярное соотношение SS-мостов и растворенного ацетилцистеина должно быть близко к эквимольному, – около 0,02 моль/л, (во всяком случае, не должно превышать!).

Последующая криогенная обработка водных растворов альбумина и ацетилцистеина, в присутствии мочевины, приводит к образованию криогелей, пространственная структура которых стабилизируется за счет гидрофобных взаимодействий. Индуцируемая моче-

виной денатурация глобулы сывороточного альбумина сама по себе не является достаточной для формирования стабильных межцепных гидрофобных контактов, поскольку замораживание-оттаивание при аналогичных условиях растворов такого белка, в частности БСА, не приводит к формированию криогелей. Рост концентрации мочевины и ацетилцистеина в исходных растворах альбумина, – в растворе при упаривании его на водяной бане, самостоятельно тоже не приводит к образованию устойчивого геля. Это указывает на необходимость совместного действия денатурирующего агента (мочевины) и восстановителя (ацетилцистеина) с последующей криогенной обработкой.

В результате такого комбинированного механизма межмолекулярной сшивки должны формироваться узлы полимерной структуры криогеля, включающие внутримолекулярные SS-мосты, встроенные в участки микросреды, более гидрофобной относительно других сегментов сольватированных в водной среде полипептидных цепей.

Концентрация мочевины, необходимая для практически полной денатурации глобул БСА в растворах превышает 5 моль/л, но такие условия в полной мере здесь не требуются. Тем более что исходные растворы с высоким содержанием мочевины, хуже замерзают ввиду криоскопического эффекта. Таким образом, при низкой концентрации тиол-содержащих восстановителей могут протекать только реакции тиолдисульфидного обмена, в результате приводящие к олигомеризации БСА-макромолекул.

Цель и задачи работы. Основной целью настоящей работы было зная кинетику и механизмы агрегации модельного белка, создать на их основе новый биологический полимер – криогель БСА, который в дальнейшем, возможно, найдет самое широкое применение в медицине и пищевой промышленности; а также изучение и описание его структуры и свойств.

Материалы и методы. Были использованы такие материалы, как бычий сывороточный альбумин (БСА), мочевина ($\geq 99.5\%$), ацетилцистеин ($\geq 99.5\%$), дистиллированная вода.

Применялись методы рН-метрии, кондуктометрии, световой микроскопии, вискозиметрии.

Методика проведения экспериментов. Формирование альбуминовых криогелей. Мы брали две навески сухого БСА массой 500 мг и растворяли при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки в двух стаканчиках в 50 мл дистиллированной воды в каждом. После этого, к полученному белковому раствору добав-

ляли по 600 мг сухого ацетилцистеина в каждый стаканчик, и снова подвергали перемешиванию на магнитной мешалке до полного растворения. Затем полученные растворы сливали в одну фарфоровую чашку и добавляли водный раствор мочевины (6 г карбамида, растворенного в 20 мл дистиллированной воды).

Полученный раствор упаривали на водяной бане до 10 мл при постоянном перемешивании. Приготовленную таким образом реакционную систему порциями по 5 мл набирали в два 5-миллиметровых пластиковых шприца, которые герметизировали колпачками, охлаждали в стакане с холодной водой, после чего погружали в хладагент камеры жидкостного криостата (96% спирт), с заранее установленной отрицательной температурой (-20 или -25 °С), где образцы выдерживали в течение 20–24 часов в строго вертикальном положении.

После этого шприцы разбирали (при комнатной температуре) для оттаивания криогелей. Каждый губчатый криогель перед проведением дальнейших операций осторожно извлекали из шприца.

Результаты и их обсуждение. При изучении под световым микроскопом было видно, что микроструктура полученного альбуминового криогеля (ув. 16×100), — состоит из массы мелких шариков, между которыми имеется свободное пространство, — т.е. полученный нами гель имеет пористую структуру.

Выводы. В нашей работе использован механизм тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина, включающий в себя образование денатурированного белка, способного к агрегации. Продемонстрирована возможность получения в дальнейшем альбуминовых криогелей, путем погружения реакционной смеси в хладагент криостата. Криогенная обработка водных растворов БСА в присутствии мочевины, и ацетилцистеина приводит к образованию белковых криогелей, пространственная структура которых стабилизирована за счет гидрофобных взаимодействий.

Учитывая такие параметры криогелей, как их способность адсорбировать белки, например, белки плазмы крови для целей дальнейшего *in vitro* выращивания различных культур клеток, а также биосовместимость и нетоксичность полимерной матрицы, а также биосовместимость альбуминовых криогелей *in vivo* можно рекомендовать такие материалы к применению в медицине.

Список литературы

1. Курганов Б.И. Кинетика тепловой агрегации белков. Биохимия. 1998. Т. 63. С. 430-432.

2. Лозинский В.И., В.К. Кулакова В.К., Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Ершов А.Г., Суханов Ю.В. Пат. РФ № 2594427 Композиция для формирования макропористого носителя, используемого при трехмерном культивировании клеток животных или человека, и способ получения указанного носителя. 2015. 28 с.
3. Маркосян К.А., Курганов Б.И. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агресом. Биохимия. 2004. Т. 69, № 9. С. 1196-1212.
4. Родионов И. А. диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук, тема: «Криогели на основе сывороточного альбумина: синтез, свойства, структура и возможности биомедицинского применения», научный руководитель: доктор химических наук, профессор В.И. Лозинский, Москва, 2017
5. Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Банкина А.Н., Бриллиантова Е.Ю. Изучение взаимодействия белков с биологически активными азотсодержащими гетероциклическими соединениями при различных значениях рН Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 34. № 5. С. 91-99.
6. Чухно А.С., Банкина А.Н., Бриллиантова Е.Ю. Кинетика процесса набухания желатины в водных растворах азолов. Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 38. № 5. С. 84-88.
7. Дмитриева И.Б., Кергенцев А.А., Чухно А.С. Определение констант диссоциации карбоксильных и аминогрупп на альбумине методом потенциометрического титрования. Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 41. № 3. С. 141-146.
8. Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Мартынов Д.В. Изоэлектрическая точка белков в водных растворах азолов. Вестник Санкт-Петербургского университета. Физика и химия. 2011. № 2. С. 124-133.
9. Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Колодеева С.С., Мартынов Д.В. Адсорбция ионов H^+ и OH^- на коллагене. Вестник Санкт-Петербургского университета. Физика и химия. 2011. № 3. С. 87-95.
10. Н.В. Константинова, В.И. Лозинский. Криотропное гелеобразование растворов овальбумина., Москва, 1997, 583 с.
11. В. М. Гунько, И. Н. Савина, С. В. Михаловский. Криогели: морфологические, структурные и характеристика адсорбции., 2013, 583 с.
12. Сердюк И., Заккай Н., Заккай Дж. Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика. Москва: КДУ, 2010. Т.1. 542 с.
13. Финкельштейн А. В., Птицын О. Б // Физика белка. М.: КДУ. 2005. 524с.

Яговкин И.В., Лужанин В.Г.
ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет Минздрава России
Санкт-Петербург
igor.jagovkin@pharminnotech.com

**Фитохимический анализ вторичных метаболитов трутовика
обыкновенного (*Fomes Fomentarius L.*)**

Были получены перспективные для дальнейшего изучения фракции, содержащие мажорные группы целевых химических веществ. Были выделены в чистом виде индивидуальные вещества из плодовых тел трутовика обыкновенного методом препаративной ВЭЖХ, в результате чего было получено 2 индивидуальных соединения, предположительно, бензотрополонового ряда.

Ключевые слова: фитохимический анализ, трутовик обыкновенный, *Fomes Fomentarius*, фоментариол, бензотролоны.

Yagovkin I.V., Luzhanin V.G.
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
Saint Petersburg

**Phytochemical analysis of secondary metabolites
of *Fomes Fomentarius L.***

Were obtained promising for further study fractions containing major groups of target chemicals. Individual substances were isolated in pure form from the fruit bodies of the common tinder fungus by preparative HPLC, as a result of which two individual compounds, presumably of the benzotropolone series, were obtained.

Key words: phytochemical analysis, *Fomes Fomentarius*, fomentariol, benzotropolones.

В настоящее время природные объекты и фармацевтические субстанции на их основе занимают значительное место в традиционной и народной медицинах [4].

Поиск новых источников биологически активных веществ (БАВ), изучение их физико-химических свойств является одной из важнейших задач фармацевтической науки. Все больше внимания уделяется изучению нефармакопейных видов природного сырья, которые нашли широкое применение в народной медицине. Большинство

лекарственных препаратов, применяемых в современной традиционной медицине, так или иначе связано с биологически активными соединениями природного происхождения. Выделение новых, ранее неизвестных БАВ интересно не только с точки зрения фармакологии, но и как процесс приобретения биологических объектов для фундаментальных исследований, например, поиска малоизученных путей биотрансформации веществ и появления вторичных метаболитов в различных видах растений и грибов. Таким образом, выделение индивидуальных природных соединений из разных видов сырья, в частности из грибов, является перспективным направлением [4, 9].

Объект настоящего исследования – плодовые тела фитопатогенного гриба *Fomes Fomentarius* – широко применяются в народной медицине, являясь потенциальным источником вторичных метаболитов, которые обладают широким спектром фармакологической активности [9].

Согласно данным литературы по фармакологии БАВ трутовика обыкновенного имеют выраженную противодиабетическую активность. Проводились эксперименты с α -глюкозидазой и дипептидилпептидазой-4 (ДПП-4), доказавшие антидиабетический потенциал фоментариола. Кроме того, у лекарственного сырья трутовика обыкновенного проявляются антиоксидантный, противовоспалительный, антиноцицептивный, антибактериальный, цитотоксический и ряд других фармакологических эффектов [2, 4, 5, 6, 7].

Целью настоящего исследования является выделение индивидуальных веществ из плодовых тел трутовика обыкновенного и определение их химической структуры с учетом экспериментальных данных качественного фитохимического анализа. В литературном обзоре – изучение фитохимического состава и медицинского применения *Fomes Fomentarius*.

Анализ литературных данных показал, что фитохимический состав трутовика обыкновенного *Fomes Fomentarius* в значительной степени представлен пигментом фоментариолом (рис. 1) и его различными производными, структура которых изучена недостаточно. Имеются перспективы для дальнейшего исследования данного вопроса в разрезе фитохимии [1, 3, 4, 8, 9].

В рамках настоящего исследования проводилась экстракция этилацетатом, метанолом, этанолом из высушенного, собранного в пределах Санкт-Петербурга и Ленинградской области в марте 2019 года трутовика обыкновенного *Fomes Fomentarius*. Затем полученные экстракты очищали методом колоночной хроматографии с использованием различных сорбентов (HP-20, Polyamide, Sephadex) и раствори-

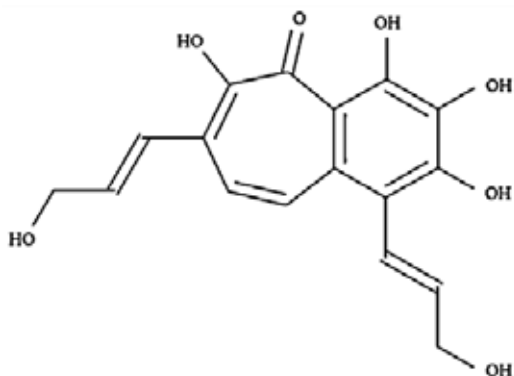


Рис. 1. Структурная формула фоментариола

телей (вода, спирт, ацетон). Проводили фракционирование методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках различной длины и диаметра с использованием методов адсорбционной (сорбент Polyamide и обращенно-фазовый сорбент Dianion HP 20 марки SUPELCO) и эксклюзионной (сорбент Sephadex LH-20) хроматографии. На сорбентах Polyamide и Diaion HP 20 проводили градиентное элюирование до 96% этилового спирта с постепенным понижением полярности изначального элюента с шагом 10%. Смесь целевых БАВ выходила при концентрации спирта в 50 – 60%. Изначальный элюентом выступала вода очищенная. Промежуточный контроль получаемых подфракций проводился методом ТСХ. Конечный контроль хроматографического разделения осуществляли методом аналитической ВЭЖХ-УФ. Анализ проводился на аналитическом ВЭЖХ LC-20 Prominence, Shimadzu, оснащенном диодно-матричным детектором при длинах волн 235, 254, 280, 340 нм (рис. 2).

УФ-спектрофотометрия показала наличие характерных для фоментариола максимумов поглощения в области 200 – 800 нм (226, 280, 332, 460) [1, 6, 10, 11].

В результате были получены перспективные для дальнейшего изучения фракции, содержащие мажорные группы целевых химических веществ. Были выделены в чистом виде индивидуальные вещества из плодовых тел трутовика обыкновенного методом препаративной ВЭЖХ, в результате чего было получено 2 индивидуальных соединения, предположительно, бензотрополонового ряда. В дальнейшем

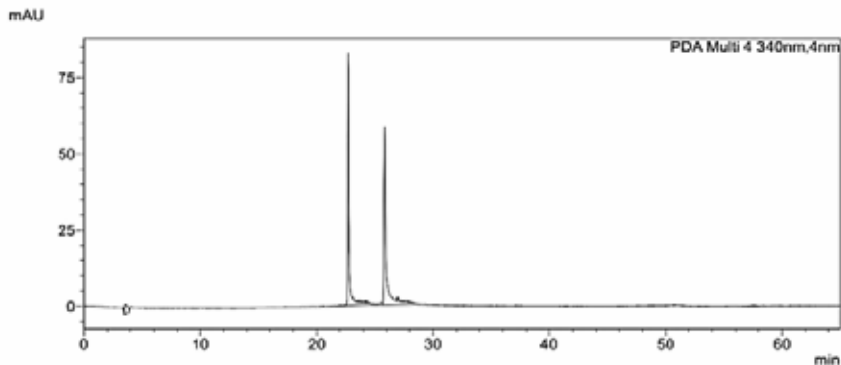


Рис. 2. Хроматограмма ВЭЖХ целевых подфракций – пики двух индивидуальных веществ

предполагается установление их химической структуры методами ЯМР-спектроскопии (Bruker DPX 300MHz NMR Spectrometer) и масс-спектрометрии (МС) высокого разрешения (Bruker Micromass Q-TOF Spectrometer).

Список литературы

1. Arpin N. Le fomentariol: Nouvelle benzotropolone isolée de Fomes fomentarius / N. Arpin, J. Favre-Bonvin, W. Steglich // *Phytochemistry*.- 1974.-№9.-vol.13.- п.1949-1952. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(74\)85123-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(74)85123-X)
2. Baisch G., Wagner B., Öhrlein R. An efficient chemo-enzymatic approach towards variably functionalized benzotropolones // *Tetrahedron*. 2010. Т. 66. №. 21. С. 3742-3748
3. Dictionary of Natural Products [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>
4. Gill M., Steglich W. Progress in the Chemist of Organic Natural Products // New York. 1987 DOI: 10.1007/978-3-7091-6971-1
5. Lee J. S. Effects of Fomes fomentarius supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. / J. S. Lee // *Nutrition Research*. 2005; 2 (25):187–195.
6. Nevena Maljurić., Jelena GolubovićI., Matjaž Ravnikar., Dušan Žigon., et al. Isolation and Determination of Fomentariol: Novel Potential

Antidiabetic Drug from Fungal Material // Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/2434691>

7. Park Y. M., Kim I. T., Park H. J. et al., Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius* Biological and Pharmaceutical Bulletin, vol. 27, no. 10, pp. 1588–1593, 2004. DOI: [10.1248/bpb.27.1588](https://doi.org/10.1248/bpb.27.1588)

8. Zang Y. Fomentarols A–D, sterols from the polypore macrofungus *Fomes fomentarius* / Y. Zang, J. Xiong, W.-Zh. Zhai et al. // Phytochemistry. 2013. vol.92. p. 137-145. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.003>

9. Сокольский, И.Н. Фармакогнозия / И.Н. Сокольский, И.А. Самылина, Н.В. Беспалова. М.: Медицина, 2003. 480 с.

10. Сычев, К.С. Практический курс жидкостной хроматографии / К.С. Сычев. КОКОРО, 2013. 272 с.

11. Цвет, М. Хроматографический адсорбционный анализ / М. Цвет. Litres, 2018.

СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

УДК 616-074

Анненко И.Ю.

*НГУ физической культуры, спорта и здоровья им. П.Ф. Лесгафта
Санкт-Петербург
i.annenko@lesgafit.spb.ru*

Динамика тестостерона в слюне у гандболистов высокой квалификации в ходе реализации различных программ предсоревновательной подготовки

Статья посвящена исследованию уровня тестостерона в слюне при выполнении спортсменами двух конкурирующих программ предсоревновательной подготовки. Отрицательная динамика концентрации данного гормона указывает на истощение адаптационных ресурсов организма и свидетельствует о несоответствии уровня подготовленности спортсмена величине тренировочных воздействий.

Ключевые слова: *тестостерон, анализ слюны, физическая нагрузка, гандбол.*

Анненко И.Ю.

*The Lesgafit National State University of Physical Education,
Sport and Health
Saint Petersburg*

Salivary testosterone level in response to different pre-competition training programs in handball

In this study the level of salivary testosterone was measured in 22 highly qualified handball players. The measurement of testosterone during extended exhausting workout period have an important role in the diagnosis of fatigue. Negative dynamics of testosterone indicates a discrepancy between the training program and the work capacity of the athlete.

Key words: *testosterone, saliva analysis, workout, handball.*

Среди актуальных задач клинико-лабораторной диагностики в спорте следует отметить поиск новых методов контроля подготовленности спортсмена, поставляющих данные в короткие сроки и позволяющих оперативно провести коррекцию тренировочной работы. В этой связи, возросший в последние годы интерес к слюне,

как субстрату лабораторных биохимических исследований видится обоснованным. Простота и неинвазивность забора биоматериала, чувствительность слюнных желез к физической нагрузке, определяют слюну как уникальный тест-объект, позволяющий многократно осуществлять оперативный и текущий контроль подготовленности спортсмена. Слюна – оптимальный биосубстрат для изучения уровня свободного тестостерона [2]. Клеточные мембраны слюнных желез, являясь биологическими фильтрами, препятствуют проникновению в слюну связанного гормона [3]. Концентрация же свободного тестостерона не зависит от скорости образования слюны и соответствует уровню несвязанной с белками фракции в сыворотке крови [6].

Цель работы: изучение динамики тестостерона в слюне гандболистов в ходе реализации различных программ предсоревновательной подготовки.

Организация исследования. Группу исследования составили гандболисты в возрасте от 19 до 22 лет, имеющие спортивную квалификацию КМС и МС. Поскольку динамика тестостерона была исследована в ходе реализации двух программ предсоревновательных мезоциклов, спортсмены были разделены на две группы по 11 человек. Группа А выполняла работу с «трехпиковой» динамикой нагрузки. В группе Б мезоцикл был построен по типу «маятника», на основе ритмического контрастного чередования нагрузок. Интегральным показателем величины выполненной нагрузки послужила пульсовая сумма тренировочной работы в течение мезоцикла.

Предсоревновательный мезоцикл охватил три недели подготовки. Забор слюны осуществляли в четыре этапа: в начале каждого недельного микроцикла и по завершению мезоцикла. Гандболисты воздерживались от приема пищи за 2 часа до исследования. Слюну отбирали в течение 10 мин в стерильные одноразовые контейнеры в состоянии физиологического покоя спортсмена. Предварительно полость рта споласкивали дистиллированной водой. Для проведения исследования слюну центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Концентрацию тестостерона определяли в надосадочной жидкости иммуноферментным методом (Testosterone Saliva. Version: 5.0.1., Diagnostics Biochem. Canada Inc., Ontario, Canada). Дополнительно в работе был применен субмаксимальный нагрузочный тест – PWC_{170} для оценки уровня физической работоспособности.

Результаты исследования. Анализ научной литературы позволил выявить два направления изучения концентрации тестостерона у спортсменов. Первое направление – исследование динамики тестостерона как реакции организма на острый стресс (механизм срочной адаптации к физическим нагрузкам). Забор материала при этом осуществляется до и после упражнения. Физическая нагрузка в гандболе характеризуется смешанной, аэробно-гликолитической направленностью. Анализ научной литературы выявил отсутствие единого взгляда специалистов на интерпретацию динамики тестостерона до и после нагрузок подобного характера. Существуют работы, свидетельствующие как о снижении [4], так и о повышении [5] секреции тестостерона при выполнении работы смешанного энергообеспечения. Предварительное исследование [1] выявило разнонаправленные изменения уровня тестостерона в слюне в группе гандболистов до и после выполнения специализированной для этого вида спорта физической нагрузки, что подтвердило низкую информативность применения данного направления в гандболе.

Второе направление – изучение базального уровня тестостерона в течение нескольких недель, месяцев подготовки (долговременная адаптация). Авторы связывают снижение данного показателя в ходе тренировочного процесса с истощением адаптационных ресурсов спортсменов, уменьшением функциональных возможностей, переутомлением [4,7,9]. Известно, что изнуряющие физические нагрузки вызывают падение уровня тестостерона в той же степени, что и отсутствие физической активности [4]. Такой подход к исследованию тестостерона был применен в данном исследовании. Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Показатели тестостерона в слюне у гандболистов

	Группа А (n=11)	Группа Б (n=11)
Концентрация тестостерона, пг/мл		
Этап 1	92,0±8,7	88,5±5,6
Этап 2	89,9±7,6	90,3±6,7
Этап 3	75,3±14,1	89,4±10,6
Этап 4	64,7±18,3	84,5±15,4
Δ1,4	13,1 (P-value=0,43407)	33,9 (P-value=0,00023)

Таблица 2. Показатели субмаксимального теста PWC_{170} и пульсовой суммы предсоревновательных мезоциклов подготовки

	Группа А (n=11)	Группа Б (n=11)
PWC_{170} , кгм/мин/кг		
Этап 1	22,1±0,8	21,8±0,8
Этап 4	21,8±1,3	22,4±0,4
$\Delta 1,4$	0,3 (P-value=0,33112)	0,6 (P-value=0,03075)
Пульсовая сумма мезоцикла подготовки	687635±28828	569609±31162

Анализ первичных результатов исследования (этап 1) показал, что концентрация тестостерона в слюне у гандболистов групп А и Б соответствует норме. Среднегрупповые значения данного показателя составили 92,0±8,7 пг/мл и 88,5±5,6 пг/мл соответственно. Мощность работы, исследованная с помощью пробы PWC_{170} , в обеих группах оценена как «высокая» и составила, в среднем, в группе А – 22,1±0,8 кгм/мин/кг, в группе Б – 21,8±0,8 кгм/мин/кг. Различия в первичных значениях концентрации тестостерона и теста PWC_{170} между группами недостоверны ($P \geq 0,05$), исследуемые группы однородны по данным показателям.

Тренировка в предсоревновательном мезоцикле направлена на окончательное становление спортивной формы гандболиста. Тренер стремится «подвести» спортсмена к состоянию оптимальной готовности к наивысшим достижениям. Так, у гандболистов группы Б, после выполнения программы предсоревновательного мезоцикла (этап 4) наблюдается повышение физической работоспособности. Мощность работы в тесте PWC_{170} , в расчете на 1 кг массы тела, возросла на 2,7% ($p < 0,05$). У гандболистов группы А достоверных изменений по данному показателю не выявлено. Анализ среднегрупповой динамики тестостерона показал достоверное уменьшение концентрации гормона у гандболистов группы А после реализации всей программы мезоцикла ($\Delta 1,4 = 33,9$ пг/мл, $P < 0,001$). Наиболее интенсивное снижение уровня данного гормона прослеживалось во втором недельном микроцикле подготовки ($\Delta 2,3 = 14,6$ пг/мл, $P < 0,05$). Как было отмечено выше, подобная динамика свидетельствует о снижении функциональных возможностей спортсменов, перетренированности. Выявление признаков накопленного утомления на данном этапе свидетельствует о неверно построенной программе подготовки и

требует оперативной коррекции тренировочной работы. У гандболистов группы Б достоверного снижения в концентрации тестостерона в слюне не обнаружено, что с учетом возросшей мощности работы в тесте PWC_{170} , свидетельствует о благоприятном течении тренировочного процесса.

Для выявления зависимости между исследуемыми показателями был проведен корреляционный анализ по Спирмену. Достоверная корреляционная зависимость выявлена лишь между показателями пульсовой суммы выполненной спортсменом работы в течение мезоцикла подготовки и изменением уровня тестостерона за этот же период. Коэффициент корреляции данных (r_s) равен 0.6245 ($n=22$), определен с использованием 5% – квантильного значения, допуская уровень достоверности 95 %. Это означает, что сила корреляции – средняя, зависимость – положительная.

Заключение. Исследование уровня тестостерона при реализации двух конкурирующих программ предсоревновательной подготовки выявило достоверное снижение концентрации этого гормона в случае применения программы тренировки с трехпиковой динамикой нагрузки. Подобные изменения связаны с накапливающейся усталостью, перетренированностью и свидетельствует о несоответствии уровня подготовленности спортсменов величине тренировочных воздействий. Данные лабораторных исследований подтверждаются снижением физической работоспособности в тесте PWC_{170} .

У гандболистов, реализовавших программу с динамикой нагрузки по типу «маятника», снижения концентрации тестостерона в слюне до и после предсоревновательного мезоцикла не выявлено, что с учетом возросшей мощности работы в тесте PWC_{170} , свидетельствует о благоприятном течении тренировочного процесса.

Выявлена положительная корреляционная зависимость средней силы между показателями пульсовой суммы выполненной спортсменом работы в течение мезоцикла подготовки и изменением уровня тестостерона в слюне за этот же период.

Список литературы

1. Анненко И.Ю. Возможности применения анализа тестостерона в слюне у гандболистов высокой квалификации // Инновационные технологии в системе спортивной подготовки, массовой физической культуры и спорта. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2019. С. 10-12.

2. Гончаров Н.П. Современные методы гормонального анализа // Проблемы эндокринологии. 2011. № 1 . С. 86-91.
3. Диденко С.Н., Алексанянц Г.Д. Особенности гормонального статуса юных гандболистов // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта. 2014. № 4(33). С. 42-46.
4. Никулин Б.А., Родионова И.И. Биохимический контроль в спорте. М. : Советский спорт, 2011. 232 с.
5. Bloomer, R.J. Effects of meal form and composition on plasma testosterone, cortisol, and insulin following resistance exercise // International Journal of Sport Nutrition, Exercise and Metabolism. 2000. № 10. P. 415-424
6. de Wit, A. E., Bosker, F.J., Giltay, E. J., de Kloet C.S., Roelofs, K, van Pelt, J., Penninx, B.W.J.H., Schoevers, R.A. Testosterone in human studies: Modest associations between plasma and salivary measurements // Andrologia. 2018. 50 (1) e12779. <https://doi.org/10.1111/>
7. Diamond, P. Trait anxiety, submaximal physical exercise and blood androgens // European journal of Applied Physiology. 1989. № 58. P. 699-704
8. Lane A.R., Hackney A.C. Relationship between salivary and serum testosterone levels in response to different exercise intensities // HORMONES. 2015. № 14(2). P. 258-264
9. Viru, A. Plasma hormones and physical exercise/ A. Viru // International Journal of Sports Medicine.-1992. №13. pp. 201-20

УДК 616-074

Анненко И.Ю.

*НГУ физической культуры, спорта и здоровья им. П.Ф. Лесгафта
Санкт-Петербург
i.annenکو@lesgaft.spb.ru*

Применение озонохемилюминесценции при оценке реакции гандболистов на физическую работу

В процессе межлабораторного исследования были проведены измерения значений интенсивности озонохемилюминесценции в пробах мочи атлетов до и после физической нагрузки. Выявлена статистически достоверная положительная корреляционная зависимость средней силы между показателями ОХЛ, белка и лактата в моче после физической нагрузки.

Ключевые слова: *озонохемилюминесценция, анализ мочи, физическая нагрузка.*

Annenko I. Y.

*The Lesgaft National State University of Physical Education,
Sport and Health, Saint Petersburg*

Effect of physical exercise on the level of chemiluminescence during ozonolysis of urine samples of handball players

We performed the measurement of intensity of ozone chemiluminescence before and after exhausting workout. Our findings show a statistically significant positive correlation between the ozone chemiluminescence index and the urine protein and lactate level.

Key words: *ozone chemiluminescence, urine analysis, workout.*

Кафедра биохимии НГУ им. П.Ф. Лесгафта совместно с Балтийским институтом экологии, политики и права, на основании договора о творческом сотрудничестве, осуществила лабораторный контроль состояния спортсменов с помощью метода, заимствованного из экологического контроля, а именно, озонохемилюминесцентного метода (ОХЛ) определения растворенного органического вещества в порции исследуемой жидкости. Данный метод основан на явлении хемилюминесценции, которая возникает в пробе при ее взаимодействии с озоном, при этом величина фототока хемилюминесценции пропорциональна сумме растворенных органических веществ [1]. Согласно нашим представлениям, данный подход актуален для изучения реакции организма на нагрузку, поскольку тут в качестве предмета исследования выступает содержание органического вещества в биологических жидкостях спортсмена, например, в моче. Изменение содержания органических веществ в моче (лактата, белка, креатинина и др.) после физической нагрузки является очевидным, находится в зависимости от двигательной активности спортсмена и подтверждено многочисленными исследованиями. Применение ОХЛ дает возможность установить суммарное содержание органических веществ в пробе мочи, что отображает итоговую, неспецифическую реакцию организма на выполненную работу.

В исследовании участвовало 20 гандболистов в возрасте – 17-19 лет. До и после физической нагрузки был проведен отбор мочи. Содержанием нагрузки был интервальный бег. Продолжительность рабочего периода нагрузки составляла 15 – 17с. За этот промежуток времени спортсмен преодолевал дистанцию 80 м – 85 м. Временное соотношение фаз работы и отдыха – 1:1. ЧСС – в пределах 160-180 уд/мин.

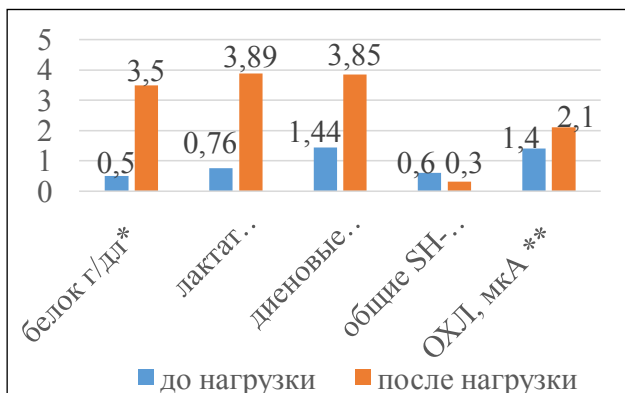


Рис. 1. Значения биохимических показателей и ОХЛ (n=20) до и после физической нагрузки (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$)

Спортсмену необходимо было выполнить 30 повторений (рабочих фаз) в ходе выполнения нагрузки. Для определения интенсивности хемилюминесценции, в работе был использован прибор OSM-02 [1]. Величину фототока ОХЛ при озонлизе проб мочи исследовали при тридцатикратном разведении. Помимо показателя ОХЛ, в моче была определена концентрация молочной кислоты, диеновых конъюгатов (ДК), свободных SH-групп, белка. Поскольку значения большинства исследуемых показателей в моче характеризуются высокой корреляцией с кровью в случае контролируемой гидратации, спортсмены, согласно рекомендациям [4,5], выпивали 500 мл воды за 30 мин до нагрузки и 500 мл после. Содержание белка в моче определяли фотометрическим методом с пирогаллоловым красным (набор «КлиниТест-БМ ПГК»). Концентрацию молочной кислоты определяли энзиматическим колориметрическим методом (набор «Ольвекс Диагностикум»). Содержание свободных сульфгидрильных групп и ДК согласно рекомендациям Романчук Л.А. и соавт.[2]. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statgraphics Plus for Windows. Статистический анализ данных включал определение значений критериев Колмогорова-Смирнова, Манна–Уитни, коэффициента корреляции Спирмена.

Рис. 1 свидетельствует о достоверных изменениях в значениях всех исследуемых показателей после физической нагрузки. Величина фототока ОХЛ возросла на треть (с 1,4 мкА до 2,1 мкА, $p < 0,001$), что соответствует идентичному увеличению концентрации органических веществ в моче. Среди процессов, способствующих повышенной экс-

креции органических веществ с мочой после нагрузки, авторы [3,6] выделяют гипоксию, повышенную выработку свободных радикалов, чрезмерное высвобождение катехоламинов, анаэробный распад глюкогена, и, как следствие – лактоацидоз. Перечисленные процессы вызывают структурно-функциональную перестройку нефроцитов, приводят к модификации мембранных липидов, снижению текучести мембран, и, как следствие, повышению их проницаемости.

Протеинурия и лактацидурия часто встречаются после физических упражнений. Степень выраженности этих состояний зависит от интенсивности двигательной деятельности, а не от ее продолжительности. После предложенной нагрузки среднегрупповые значения концентрации белка возросли в 7 раз (с 0,5 г/дл до 3,5 г/дл), лактата в 5 раз (0,76 ммоль/л до 3,89 ммоль/л).

Концентрация свободных сульфгидрильных групп служит количественной характеристикой состояния неферментативного звена антиоксидантной системы (АОС). После нагрузки выявлено достоверное снижение концентрации свободных SH-групп. Известно, что накопление хотя бы одного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) является характерным признаком интенсификации окисления свободными радикалами. Возросшая экскреция ДК (с 1,44мкмоль/л до 3.85 мкмоль/л), как конечных продуктов пероксидации липидов, характеризуют неспособность АОС противостоять чрезмерной активации перекисных процессов.

Для выявления зависимости между исследуемыми показателями был проведен корреляционный анализ по Спирмену. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Значения коэффициентов корреляции Спирмена между изменениями значений показателей до и после физической нагрузки

	Показатели	1	2	3	4	5
1	Δ ОХЛ, мкА	1	0,567*	0,560*	-	-
2	Δ Белок, г/л		1	0,531*	-	-
3	Δ Лактат, ммоль/л			1	-	-
4	Δ Диеновые конъюгаты, мкмоль/л				1	-
5	Δ Общие SH-группы, мкмоль/л					1

* $p < 0,05$.

Как следует из таблицы, выявлена корреляционная связь изменения (Δ) показателей ОХЛ и белка ($r_s=0,567$, $p<0,05$) сила корреляции – средняя, зависимость – положительная; показателей ОХЛ и лактата ($r_s=0,560$, $p<0,05$) сила корреляции – средняя, зависимость – положительная. Достоверные значения коэффициента Спирмена зафиксированы также между изменениями показателей концентрации белка и лактата ($r_s=0,531$, $p<0,05$).

Заключение. Применение озонохемилюминесценции для контроля состояния спортсменов, реакции организма на физическую нагрузку видится перспективным и требует дополнительных исследований. Изменение значений фототока хемилюминесценции при озонолизе проб мочи гандболистов до и после физической нагрузки характеризуется уровнем значимости $p<0,001$. В ходе исследования выявлена статистически достоверная положительная корреляционная зависимость между изменением показателей ОХЛ, белка и лактата в моче после физической нагрузки.

Список литературы

1. Анненко И.Ю., Никанорова, М.Н. Использование метода озонохемилюминесценции для оценки реакции организма на физическую нагрузку//Материалы итоговой научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава НГУ физической культуры, спорта и здоровья им. П.Ф. Лесгафта. 2013. С. 46-47.
2. Романчук, Л.А. Определение биохимических показателей перекисного окисления и состояния антиоксидантной системы в организме. СПб.: СПбГАФК им. П.Ф.Лесгафта, 1997. 31 с.
3. Bellinghieri G., Savica, V., Santoro D. Renal alterations during exercise // Journal of renal nutrition. 2008 . № 18(1). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18089464/> (дата обращения: 17.08.2020)
4. Nikolaidis S., Kosmidis I., Sougioultzis M., Kabasakalis A., Mougios V. Diurnal variation and reliability of the urine lactate concentration after maximal exercise //Chronobiology International . 2018. № 35(1) . P. 24-34
5. Nikolaidis S., Kosmidis I., Koulidou T., Panagakis S., Mougios V. Improved reliability of the urine lactate concentration under controlled hydration after maximal exercise // Biomarkers . 2017 . № 22(7) . P. 614-620.
6. Shephard R.J. Exercise proteinuria and hematuria: current knowledge and future directions //The Journal of sports medicine and physical fitness. 2016. №56 (9). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25854772/> (дата обращения: 17.08.2020)

Анимова П.В., Болдина Н.В.
Курский государственный медицинский университет,
Курск
Polina.ansimova@mail.ru, natalja.bldina@rambler.ru

Клиническая диагностика болезни Крона

Болезнь Крона – хроническое заболевание с периодами ремиссии органов желудочно-кишечного тракта неустановленной этиологии, проявляющееся трансмуральным распространением воспалительного поражения с возникновением осложнений. Это обуславливает разнообразные диагностические критерии данной патологии.

Ключевые слова: *болезнь Крона, клиническая диагностика, желудочно-кишечный тракт.*

Анимова П.В., Болдина Н.В.
Kursk State Medical University
Kursk

Clinical diagnosis of Crohn's disease

Crohn's disease is a chronic disease with periods of remission of the gastrointestinal tract of unknown etiology, manifested by the transmural spread of inflammatory lesions with the occurrence of complications. This leads to a variety of diagnostic criteria for this pathology.

Key words. *Crohn's disease, clinical diagnosis, gastrointestinal tract.*

Заподозрить болезнь Крона можно по следующим критериям в анамнезе: эпизоды диареи, боли в животе, случаи лихорадки неясной этиологии, анемии неустановленной этиологии, аппендэктомия, кишечная непроходимость, внекишечные симптомы (поражения костей и суставов). Также непосредственно во время осмотра можно выявить такие критерии, как уменьшение массы тела, повышение температуры тела, анемия, боли в животе, наружные свищи, абдоминальный инфильтрат.

Внекишечные проявления подразделяют на аутоиммунные, связанные с активностью болезни, и аутоиммунные, не связанные с активностью болезни.

Диагностическими признаками аутоиммунных проявлений, связанных с активностью патологии, являются артралгии, артриты, узловатые эритемы, пиодермии, стоматиты, увеиты, ириты, эписклериты.

К характерным особенностям аутоиммунных проявлений, не связанных с активностью заболевания, относят ревматоидный артрит, анкилазирующий спондилоартрит, склерозирующий холангит, остеомаляцию, экзему.

Одним из методов диагностики болезни Крона является эндоскопический метод. В связи с чем выделяют эндоскопические критерии: регионарное поражение слизистой, линейные язвы, язвы – трещины, афты, стриктуры.

Наиболее достоверным диагностическим исследованием является рентгеноскопия органов желудочно-кишечного тракта (также относятся рутинные исследования толстой и тонкой кишки, рентгеновская компьютерная томография, магнитно-резонансная компьютерная томография). Выделяют рентгенологические критерии: прерывистое поражение, стриктуры, свищи, межкишечные абсцессы.

Морфологические исследования – это объективные методы исследования, которые являются неотъемлемой частью в лечебно-диагностическом исследовании болезни Крона. Наиболее распространенными методами данного исследования является гистологический анализ, исследование биоптата. В ходе проведения таких исследований выявляются следующие характерные критерии: саркоидные гранулемы, щелевидные язвы в подслизистом и мышечном слоях, трансмуральное воспалительное поражение, регионарное поражение [2].

Для определения степени активности болезни Крона используют ультразвуковое исследование, обладающее высокой информативностью в исследовании воспалительных заболеваний кишечника. По сравнению с другими инструментальными методами исследования данный метод лишен недостатков, обусловленные риском обострения заболевания при подготовке к обследованию и облучением. Проведена сравнительная оценка по данным результатов ультразвукового исследования в зависимости от стадии заболевания (табл. 1).

Воспалительные заболевания кишечника являются серьезной проблемой в современной гастроэнтерологии. Единый взгляд на решение проблемы среди практикующих врачей, ранняя диагностика и адекватное лечение, а также полноценное консервативное лечение и своевременно выполненная операция определяют благоприятный исход данной патологии [1].

Таблица 1. Сравнительная оценка результатов ультразвукового исследования в зависимости от стадии воспалительного процесса

Признаки воспаления слизистой кишечника по данным ультразвукового исследования	Стадии воспалительного процесса			
	Ремиссия		Обострение	
	абсолютное число больных	относительное число больных	абсолютное число больных	относительное число больных
Толщина кишечной стенки:				
– не утолщена	10	70	2	3,5
– утолщена	5	30	29	96,5
Патологическая васкуляризация:				
– слабая	5	25,2	3	55,4
– выраженная	2	74,8	10	44,6
Структура кишечной стенки:				
– не изменена	15	92	7	20
– изменена	2	8	25	80
Всего больных	39	100,0	76	100,0

Список литературы

1. Белоусова, Е. А. Рекомендации по диагностике и лечению болезни Крона/ Е.А. Белоусова //Фарматека. 2009. Т. 187, №. 13. С. 38-44.
2. Воробьев, Г. И. Возможности ультразвукового исследования в диагностике болезни Крона/ Г.И. Воробьев //Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2010. Т.1, №. 1. С. 29-36.

УДК 616

*Асатрян Т.Т., Жиленкова Ю.И., Зенина М.Н.,
Зимица В.А., Гайковая Л.Б.
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России
Санкт-Петербург
asatryan-tatev@mail.ru*

Диагностика врожденных состояний патологии эритроидного роста

Наследственные патологии эритроидного роста зачастую представляют собой сложные для дифференциальной диагностики случаи. Это связано как с относительно невысокой частотой встречаемости

данных нозологий, так и с затруднением в выборе подтверждающих тестов.

В данной статье авторы рассматривают современные возможности лабораторной диагностики на примере трех клинических случаев гемолитических анемий: гемоглобинопатии, мембранопатии, а также их сочетания.

Ключевые слова: наследственный сфероцитоз, овалоцитоз, бета-талассемия, клинический анализ крови.

*Asatryan T.T., Zhilenkova Y.I., Zenina M.N.,
Zimina V.A., Gaykovaya L.B.*

*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
Saint Petersburg, Russia*

Diagnosis of congenital conditions of red blood cells disorders

Hereditary pathologies of different types of red blood cell disorders are often difficult cases for differential diagnosis. This is due to both the relatively low frequency of hereditary nosologies and the difficulty in choosing confirmatory tests.

In this article, the authors consider modern possibilities of laboratory diagnostics on the example of three clinical cases of hemolytic anemia: hemoglobinopathy, membranopathy, and their combination.

Key words: ovalocytosis, beta-thalassemia, complete blood count, hereditary spherocytosis.

Наследственные гемолитические анемии имеют схожие симптомы, поэтому дифференциальная диагностика представляет некоторые трудности. Для постановки правильного диагноза необходимо провести широкий спектр диагностических тестов. В данной статье авторы рассматривают современные возможности лабораторной диагностики на примере трех клинических случаев гемолитических анемий: гемоглобинопатии, мембранопатии, а также их сочетания.

Клинический случай 1. Пациент, мужчина, 20 лет, русский, при прохождении планового обследования в Военном комиссариате был направлен к гематологу в связи с выявленными в гемограмме изменениями (снижение гемоглобина).

Для диагностики анемического синдрома определяли основные эритроцитарные параметры в рамках клинического анализа крови на анализаторе Sysmex XN-9000 (Sysmex, Япония): концентрация гемоглобина (Hb, г/л), количество эритроцитов (RBC, $\times 10^{12}/л$), средний

объем эритроцита (MCV, фл), среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (MCH, пг), ширина распределения эритроцитов по объему (RDW, %), % микроцитов (MicroR) с объемом ниже 60 фл; % гипохромных эритроцитов (Hypo-He) с содержанием Hb ниже 17 пг.

При анализе периферической крови были получены следующие результаты: концентрация гемоглобина (Hb) 121 г/л, число эритроцитов (RBC) $5,79 \times 10^{12}$ /л; эритроцитарные параметры: MCV 66,3 фл, MCH 20,9 пг, RDW 14,6%; ретикулоциты – 1,25%. Процент микроцитов (%MicroR) составил 37,9% (при референтных значениях до 15%). Процент гипохромных эритроцитов (%Hypo-He) с содержанием Hb ниже 17 пг – 3,2%. Таким образом, у пациента была установлена анемия микроцитарная, гипохромная, легкой степени. Обращал на себя внимание значительное снижение объема эритроцитов и содержания гемоглобина в эритроците, что характерно для глобиновых аномалий [2]. Поэтому были рассчитаны дополнительные эритроцитарные индексы, предназначенные для выявления пациентов с талассемией: индекс Менцера ($M = MCV/RBC$) – основан на использовании общедоступных параметров гематологических анализаторов; индекс Урречаги ($M-H-RDW = \%MicroR - \%Hypo-He - RDW-CV$) – учитывает информацию о субпопуляциях эритроцитов, полученную на анализаторах с технологией проточной цитофлуометрии. При пороговых значениях для индекса $M < 11,5$ и $M-H-RDW > -5,1$ можно говорить о высокой вероятности гемоглобинопатии, в первую очередь талассемии [5]. У пациента были получены следующие результаты: индекс M 11,4 ($< 11,5$), индекс Урречаги 20,1 ($> -5,1$), что позволило с высокой долей вероятности заподозрить талассемию.

При анализе окрашенного мазка крови (окраска по Романовскому–Гимзе) нарушения были обнаружены мишеневидные эритроциты 4-6 в п/з (рис. 1), характерные для гемоглобинопатии.

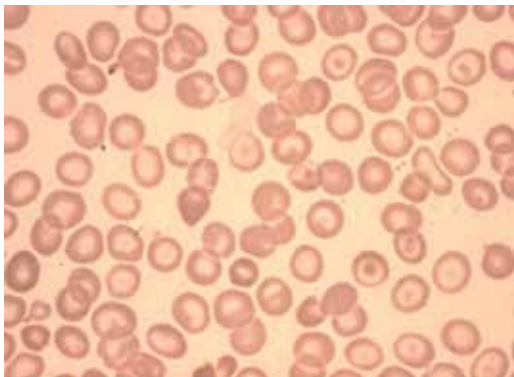


Рис. 1. Морфологическая картина периферической крови пациента (мишеневидные эритроциты). Окраска по Романовскому–Гимзе ($\times 1000$)

Также пациенту было проведено исследование показателей обмена железа на анализаторе Cobas 6000 (Roche, Швейцария), что позволило исключить железодефицитную анемию (ЖДА): железо сыворотки 21,4 мкмоль/л (11,6-31,3 мкмоль/л), ферритин сыворотки 96,3 нг/мл (при референтных значениях 30-300 нг/мл), ОЖСС 49,1 мкмоль/л (при референтных значениях 44,8-76,1 мкмоль/л), СРБ 0,4 мг/л (при референтных значениях 0-5 мг/л). В сыворотке крови также отмечалась небольшая гипербилирубинемия (общий билирубин – 23 мкмоль/л при референтных значениях до 20,5 мкмоль/л).

Для подтверждения гемоглобинопатии (талассемии) и определения ее варианта провели исследование фракций гемоглобина методом капиллярного электрофореза (Minicap, Sebia). Распределение фракций (увеличение HbA₂ до 8,6% при норме до 3,2% и HbF до 2,8% при референтных значениях до 1%) позволило подтвердить диагноз бета-талассемии (малой формы).

Клинический случай 2. Пациентка Г., 23 года, русская, обратилась к гематологу с жалобами на общую слабость, снижение работоспособности, высокую утомляемость, сонливость. На момент осмотра у гематолога – состояние удовлетворительное. Кожа и видимые слизистые оболочки обычной окраски и влажности, без геморрагий. Пульс ритмичный. Тоны сердца ясные, ритмичные. В легких везикулярное дыхание, хрипов нет. Живот при пальпации мягкий, безболезненный. Печень у края реберной дуги, селезенка не пальпируется. Отеков нет. Анамнез не отягощен.

При проведении клинического анализа крови с расчетом основных и интегральных эритроцитарных параметров были получены следующие результаты: Hb 130 г/л, RBC $4,19 \times 10^{12}$ /л, MCV 83,1 фл, MCH 31,0 пг, MCHC 374 г/л, RDW 16,6%, Hb/MCHC 0,34 (при референтном значении более 8,7), MCHC/RDW 22,5 (при референтном значении более 24,3). При микроскопии мазка периферической крови был обнаружен умеренный анизоцитоз, пойкилоцитоз (микросфероцитоз) эритроцитов, полихроматофилия (рис. 2). Полученные данные (Hb/RDW 7,8, MCHC/RDW 22,5 и обнаружение микросфероцитов в мазке ПК) дали возможность предположить наличие наследственного сфероцитоза [4]. Для подтверждения диагноза были проведены дополнительные исследования.

Далее нами был проведен глицериновый тест по определению скорости лизиса эритроцитов, который выявил ускорение разрушения эритроцитов, что характерно для наследственного сфероцитоза [3] (рис. 3).

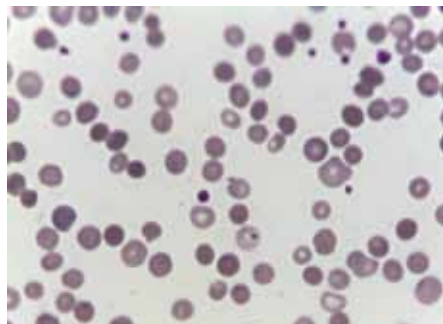


Рис. 2. Морфология микросфероцитов в мазке периферической крови пациентки Т. Окраска по Романовскому–Гимзе ($\times 1000$)

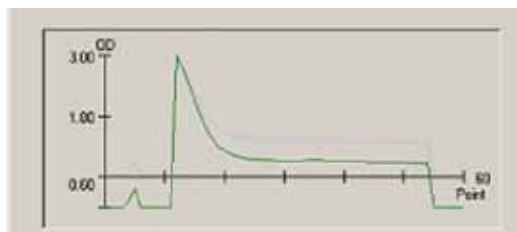


Рис. 3. Графическое представление кинетики лизиса эритроцитов пациентки Т.

Расчет морфометрических параметров эритроцитов показал, что популяция микросфероцитов составила 40%, повышен показатель толщины эритроцитов (2,84 мкм, при референтных значениях 1,9-2,3 мкм), снижены значения среднего диаметра эритроцитов (5,2 мкм при референтных значениях 7,3-7,5 мкм) и индекса сферичности эритроцитов (1,3 при референтных значениях 2,6-3,0), нормоциты составили 60%.

Для уточнения наследственного характера заболевания нами был проведен тест на связывание красителя эозин-5-малеимида (ЭМА-тест) методом проточной цитометрии при помощи анализатора FC-500 (Beckman Coulter, США). ЭМА-тест выявил у пациентки снижение интенсивности экспрессии эозин-5-малеимида (79%), что подтвердило наличие НС [1].

Анализ результатов исследования позволил выставить клинический диагноз: наследственный сфероцитоз (болезнь Минковского-Шоффара) с латентным течением заболевания.

Клинический случай 3. Пациентка, девочка 7 лет, была направлена к гематологу для установления причины анемии.

При анализе периферической крови были получены следующие результаты: концентрация гемоглобина (Hb) 106 г/л, число эритроцитов (RBC) $5,65 \times 10^{12}$ /л; эритроцитарные параметры: MCV 57,9 фл, MCH 18,8 пг, RDW 19,7%; ретикулоциты – 1,63%. Процент микроцитов (%MicroR) составил 69,6%. Процент гипохромных эритроцитов (%Hypo-Hc) с содержанием Hb ниже 17 пг – 30,4%. Таким образом, у пациентки была констатирована анемия легкой степени с выраженным микроцитозом, гипохромией и эритроцитозом. Дополнительно были рассчитаны интегральные эритроцитарные индексы: индекс Менцера составил 10,2 (<11,5), индекс Урречаги – 19,5 (>-5,1), что позволило с высокой долей вероятности заподозрить талассемию.

Надо отметить, что в ходе исследования также возникли трудности с подсчетом тромбоцитов на гематологическом анализаторе: при обычном измерении число тромбоцитов составило 1180×10^9 /л с «флагами» о неоднородности популяции эритроцитов и фрагментах эритроцитов, что требовало дополнительной оценки. После повторного измерения в PLT-F-канале (с флуоресценцией) – 291×10^9 /л.

При анализе окрашенного мазка был выявлен выраженный пойкилоцитоз за счет овалоцитов и эллиптоцитов (>10%), что характерно для мембранопатии – наследственного овалоцитоза (рис. 4). Таким образом, было заподозрено сочетание двух наследственных патологий: мембранопатии и талассемии.

Также пациентке было проведено исследование показателей обмена железа (для исключения дефицита железа) и оценены маркеры гемолиза в сыворотке крови (общий билирубин и его фракции) на ана-

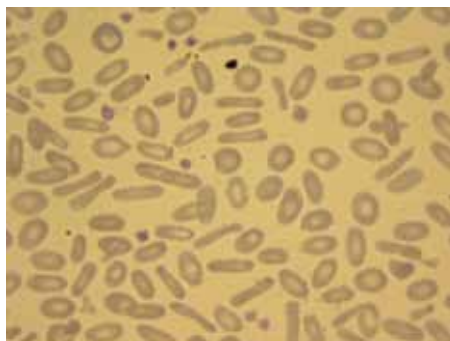


Рис. 4. Морфологическая картина периферической крови пациентки (овалоциты, эллиптоциты)

лизаторе Cobas 6000 (Roche, Швейцария). В сыворотке крови отмечалось нормальное содержание железа (17,6 мкмоль/л), трансферрина (2,65) г/л ферритина (53,8 мкг/л) при небольшом увеличении общего билирубина (22,5 мкмоль/л).

Распределение фракций (увеличение HbA₂ до 6,5% при норме до 3,2%) позволило подтвердить диагноз малой формы бета-талассемии. При этом ЭМА-тест выявил снижение экспрессии красителя эозин-5-малеимида методом проточной цитометрии на анализаторе FC-500 (Beckman Coulter, США) (средняя интенсивность флюоресценции составила 79%), что свидетельствует о дефекте белкового компонента мембраны эритроцитов. В совокупности с особенностями морфологии эритроцитов, а именно наличия овалцитов и эллиптоцитов, можно подтвердить диагноз наследственного овалоцитоза.

Заключение. Разнообразие вариантов наследственных гемолитических анемий при их низкой распространенности и сложности выбора подтверждающих исследований затрудняют диагностический поиск. Возможности клинического анализа с использованием современных гематологических анализаторов позволили проводить гематологическое исследование с большим (от 30 до 70) перечнем параметров.

Наличие микроцитоза и гипохромии, расчетные интегральные эритроцитарные индексы (Менцера и Урречаги) позволили определить последовательность лабораторных анализов и причины изменений эритроидных показателей. Несмотря на развитие лабораторных технологий в гематологии, изучение морфологических особенностей эритроидных клеток в окрашенных мазках крови продолжает оставаться доступным и достаточно надежным методом для выявления патологии эритроцитов.

Список литературы

1. Fanhchaksai K. Flow Cytometric Test with Eosin-5-Maleimide for a Diagnosis of Hereditary Spherocytosis in a Newborn. Case Rep / K. Fanhchaksai, S. Manowong, R. Natesirinikkul, L. Sathitsamitphong, P. Charoenkwan // Hematol. 2019. Vol. 2019. doi:10.1155/2019/5925731
2. Urrechaga E., Borque L., Escanero J.F. The role of automated measurement of RBC subpopulations in differential diagnosis of microcytic anemia and β -thalassemia screening. // Hematopathology. 2011. V. 135. P. 374-379.
3. Асатрян Т.Т. Значимость глицеринового теста с графическим определением скорости лизиса эритроцитов для скрининга наследственного сфероцитоза/ Асатрян Т.Т., Гайковая Л.Б., Слепышева В.В. Трансляционная медицина. 2019;6(6) – с. 26 – 34

4. Асатрян, Т.Т. Современные подходы к лабораторной диагностике микросфероцитарных анемий / Асатрян Т.Т., Зенина М.Н., Гайковая Л.Б. // Медицинский алфавит. 2019; 3 (22). с. 22 – 27

5. Жиленкова Ю.И., Зенина М.Н., Козлов А.В., Бессмельцев С.С., Пшеничная К.И., Ивашикина Т.М. Использование эритроцитарных индексов для скрининга бета-талассемии / Медицинский алфавит. 2015. Том 3 (Современная лаборатория), № 11. С. 60-63

УДК 576.535:616.36-006:543.544:543.51

***Бакакина Ю.С.¹, Бабарико Д.В.¹, Шингель А.М.¹, Сяхович В.Э.¹,
Николаевич Л.Н.², Беляев С.А.¹, Прадун С.А.¹***

УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория»¹

а.г. Лесной, Беларусь

ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»²

Минск, Беларусь

y.bakakina@antidoping.by

Исследование гликопротеомного профиля клеток гепатоцеллюлярного рака в условиях *in vitro* с использованием методов протеомики

Гликопротеомный профиль культуры клеток гепатоцеллюлярного рака человека HepG2 охарактеризован методом хромато-масс-спектрометрии с использованием подобранных условий. Осуществлен аннотационный анализ и функциональная классификация гликопротеинов, идентифицированных в клетках HepG2.

Ключевые слова: *гепатоцеллюлярная карцинома, гликопротеом, масс-спектрометрия, клеточная линия HepG2.*

***Bakakina Y.S.¹, Babaryko D.V.¹, Shynhel A.M.¹, Syakhovich V.E.¹,
Nikolaevich L.N.², Beliaev S.A.¹, Pradun S.A.¹***

National Anti-Doping Laboratory¹

Lesnoy, Belarus

Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus²

Minsk, Belarus

Study of the glycoproteomic profile of hepatocellular carcinoma cells *in vitro* using proteomic methods

The glycoproteomic profile of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was characterized using liquid chromatography coupled to mass

spectrometry. Glycoproteins identified in HepG2 cells were annotated and functionally classified.

Key words: *hepatocellular carcinoma, glycoproteome, mass-spectrometry, HepG2 cell line.*

Введение. Гепатоцеллюлярный рак (ГЦР) является самой распространенной нозологической формой в структуре онкологических заболеваний печени. Отличительной особенностью клеток ГЦР является аберрантное гликозилирование как поверхностных, так и внутриклеточных белков. Известно, что гликозилирование белков выполняет ключевую роль в реализации различных биологических процессов, включая пролиферацию, клеточную адгезию, клеточную сигнализацию и иммунный ответ [1]. В то же время, нарушения в характере углеводной модификации белков обуславливают такие злокачественные свойства клеток как, миграция, инвазивность, метастазирование, жизнеспособность, а также их взаимодействие с микроокружением [2]. Многие известные на данный момент поверхностные маркеры раковых клеток, являются гликопротеинами, например, раковые антигены СА 15-3, СА 19-9, СА 125 [3]. На сегодняшний день, несмотря на активные исследования в области выявления нарушений процессов гликозилирования белков при злокачественных новообразованиях, данные об изменениях гликопротеома при ГЦР ограничены и требуются дальнейшие исследования.

В связи с этим, целью данной работы было исследование гликопротеомного профиля клеток ГЦР в условиях *in vitro* с использованием методов протеомики.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись клетки перевиваемой линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Культивирование клеток линии HepG2 проводили в полной питательной среде α -MEM (Lonza, Бельгия), содержащей 10% бычьей сыворотки и 1% смеси антибиотиков (Gibco, США), в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. После достижения монослоя 80% конфлюентности клетки снимали с поверхности чашек Петри при помощи трипсина. Подсчет и оценку жизнеспособности проводили с использованием автоматического счетчика клеток Cell Counter II (Thermo Scientific, США).

Для выделения общего белка клетки HepG2 (5×10^6 клеток) отмывали 0,01 М калий-фосфатным буфером pH 7,4 (Sigma-Aldrich, США) и центрифугировали при $1\,000 \times g$ 5 мин при 4 °С. К клеткам (3 воспроизведения) добавляли лизирующий буфер, содержащий 0,025 М трис-

HCl (pH 7,6), 0,15 M NaCl, 0,1% додецилсульфат натрия (вес/объем), 0,5% дезоксихолат натрия (вес/объем), 1% тритон X-100 (вес/объем) и 1% смесь ингибиторов протеаз млекопитающих (вес/объем) (Roche, Швейцария). Лизис клеток проводили в течение 90 мин при 4 °С на планшетном шейкере при 300 об./мин. Далее образцы обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин при 4 °С. После чего центрифугировали при 15 000×g в течение 20 мин при 4 °С. Концентрацию белка в супернатанте определяли спектрофотометрически с помощью метода Бредфорд [4].

Восстановление и алкилирование белков, выделенных из клеток HerG2, проводили с использованием коммерческого набора Proteo Prep Reduction and Alkylation Kit (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Далее белки осаждали ацетоном в течение 16 ч при минус 20 °С и центрифугировали при 16 000×g 15 мин при 4 °С. Белковые осадки высушивали и растворяли в 0,1 М бикарбонате аммония (pH 8,5).

Для дегликозилирования белков использовали 20 мкл раствора N-гликозидазы PNGase-F (Sigma-Aldrich, США). Полученную реакционную смесь инкубировали при 37 °С 16 ч. Для гидролиза белков в образцы вносили 10 мкл раствора трипсина (1 мг/мл) и инкубировали при 37 °С 20 ч.

Полученную смесь пептидов разделяли изоэлектрофокусированием (ИЭФ) на иммобилизованном градиенте (OFFGEL-стрипы, 24 см), pH 3-10 (Agilent technologies, США) с использованием OFFGEL фракционатора Agilent 3100 (Agilent technologies, США) согласно протоколу фирмы-изготовителя. В ячейки для ИЭФ вносили раствор пептидов (800 мкг белка) в 3,6 мл регидрационного буфера (Agilent technologies, США). ИЭФ проводили при силе тока равной 50 мкА/гель и изменении напряжения с 500 В до 4000 В в течение 100 ч.

Собранные отдельные фракции пептидов (24 фракции) разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на паре последовательно соединенных обращенно-фазных колонок Aeris Widepore XB-C8 размером 250 мм×2,1 мм, размер частиц 3,6 мкм, размер пор 300 Å (Phenomenex, США), Aeris Peptide XB-C18 размером 250 мм×2,1 мм, размер частиц 2,6 мкм, размер пор 300 Å (Phenomenex, США). Разделение пептидов проводили с использованием сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США) с 147-минутным градиентом от 5% до 95% ацетонитрила (с 0,1 % муравьиной кислотой) в воде при скорости потока 0,2 мл/мин. В качестве базового раствора использо-

вали 0,1 % муравьиной кислоты в воде. Масс-спектрометрическая детекция осуществлялась на масс-спектрометре высокого разрешения Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США). Детекцию пептидов проводили масс-спектрометрически в режиме «зависимого от данных MS/MS анализа» в трех технических повторениях. MS/MS деградации подвергались все ионы с зарядом +2 и более и с интенсивностью не менее 1000 единиц.

Для анализа масс-спектрометрических данных использовали биоинформационную платформу MaxQuant (Max Planck Institute of Biochemistry, v. 1.6.14) [5]. Для идентификации белков использовали встроенный в программное обеспечение поисковый алгоритм Andromeda, идентификацию проводили относительно FASTA файла, содержащего аминокислотные последовательности белков для таксона *Homo sapiens* (21-02-2019) и её инвертированного аналога для вычисления частоты ложноположительных identifications FDR. Для белков и пептидов пороговое значение FDR составляло 0,01. Толерантность для родительских и дочерних ионов составляла 20 ppm.

Аннотационный анализ и функциональную классификацию белков проводили с использованием программного обеспечения FunRich v.3.1.3 [6].

Результаты исследования и их обсуждение. Для поиска биомаркеров злокачественных новообразований, в частности, ГЦР, перспективным представляется исследование особенностей гликопротеомного профиля клеток ГЦР с использованием методов протеомики.

В качестве объекта исследования была выбрана клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, поскольку доказана ее геномная и транскриптомная идентичность первичной опухоли ГЦР [7].

С целью изучения особенностей гликопротеомного профиля клеток ГЦР были подобраны оптимальные условия для исследования белков культуры гепатоцитов человека HepG2 методом хромато-масс-спектрометрии. С целью повышения выявляемости белков культуры клеток HepG2 было осуществлено предварительное разделение пептидов белков, выделенных из клеток линии HepG2, на 24 фракции методом offgel-электрофореза с последующим проведением их анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

Сочетание подходов фракционирования смеси пептидов с помощью offgel-электрофореза и анализа пептидов методом ВЭЖХ-МС/МС представляется эффективной стратегией для изучения сложных образцов.

Предварительное разделение смеси пептидов методом offgel-электрофореза позволило повысить выявляемость белков клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 в 2,2 раза по сравнению с ВЭЖХ-МС/МС пептидов без проведения их фракционирования.

В результате проведенной работы с помощью условий, подобранных для исследования протеомного профиля клеток линии HepG2 с использованием методов offgel-электрофореза и ВЭЖХ-МС/МС, было выявлено 570 гликопротеинов, что составляет 13% от всех идентифицированных белков клеток линии HepG2.

На рисунке 1 представлена функциональная классификация гликопротеинов, выявленных в клетках линии HepG2, в зависимости от клеточной локализации, выполняемых молекулярных функций и биологических процессов, в которых они участвуют.

Установлено, что с помощью условий, подобранных для исследования протеомного профиля клеток линии HepG2, были выявлены как цитоплазматические, так и мембранные белки (рис. 1, *а*). Анализ по генным онтологиям показал, что наиболее значимыми молекулярными функциями гликопротеинов культуры гепатоцитов человека HepG2 являются транспортная (14%), каталитическая (8%) и рецепторная активность (7,5%) (рис. 1, *б*). Большинство белков с каталитической активностью относятся к классам гидролаз (3,9%) и трансфераз (3,4%), среди которых представлены гликозилтрансферазы. Известно, что гликозилтрансферазы играют важную роль в синтезе гликопротеинов и необходимы для поддержания гомеостаза клетки [8].

Заключение. Изменения в процессах гликозилирования поверхностных клеточных белков наблюдаются при злокачественной трансформации. Большинство поверхностных белков клеток ГЦР подвергаются гликозилированию в ходе инвазии и метастазирования опухоли. Следовательно, характеристика гликопротеинов на поверхности раковых клеток может предоставить важную информацию для диагностики и лечения рака печени, а также позволит выявить потенциальные диагностические биомаркеры и терапевтические мишени ГЦР.

В настоящей работе были подобраны оптимальные условия для исследования гликопротеомного профиля культуры клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 с использованием методов offgel-электрофореза и ВЭЖХ-МС/МС. Осуществлен аннотационный анализ гликопротеинов, выделенных из культуры клеток HepG2.

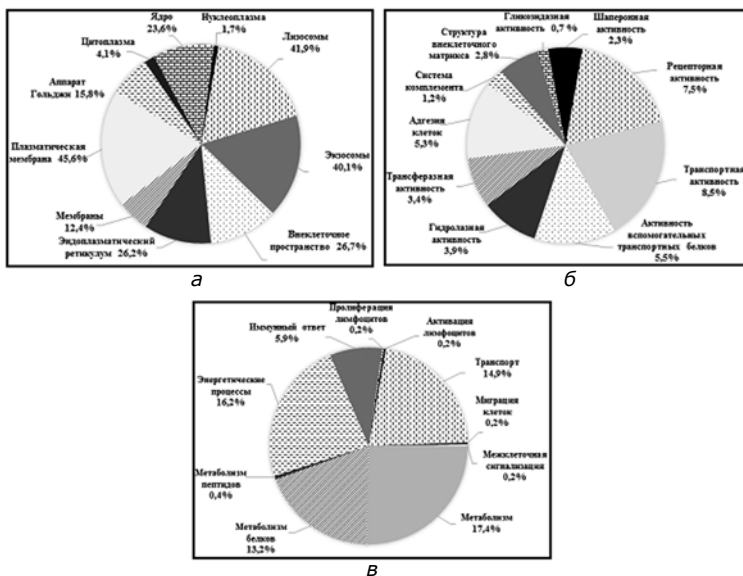


Рис. 1. Классификация выявленных гликопротеинов культуры гепатоцитов человека HepG2 в зависимости от локализации (а), молекулярных функций (б) и биологических процессов, в которых они участвуют (в)

Список литературы

1. *Biological roles of glycans* / A. Varki / Glycobiology. 2017. Vol. 1. P. 3-49.
2. *Cell surface protein glycosylation in cancer* / M.N. Christiansen, J. Chik, L. Lee, M. Anugraham, J.L. Abrahams, N.H. Packer // Proteomics. 2014. Vol. 14. P. 525-546.
3. *Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges* / A.K. Füzéry, J. Levin, M.M. Chan, D.W. Chan // Clin. Proteomics. 2013. Vol. 10. Article number: 13.
4. *A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding* / M.M. Bradford // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248-254.
5. *The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics* / S. Tyanova, T. Temu, J. Cox // Nat. Protoc. 2016. Vol. 11. P. 2301-2319.
6. *FunRich: a standalone tool for functional enrichment analysis* / M. Pathan, S. Keerthikumar, C.S. Ang, L. Gangoda, C.M.J. Quek,

N.J. Williamson, D. Mouradov, O.M. Sieber, R.J. Simpson, A. Salim, A. Bacic, A.F. Hill, D.A. Stroud, M.T. Ryan, J.A. Agbinya, J.M. Mariadasson, A.W. Burgess, S. Mathivanan // *Proteomics*. 2015. Vol. 15. P. 2597-2601.

7. *Hepatocellular carcinoma cell lines retain the genomic and transcriptomic landscapes of primary human cancers* / Z. Qiu, K. Zou, L. Zhuang, J. Qin, H. Li, C. Li, Z. Zhang, X. Chen, J. Cen, Z. Meng, H. Zhang, Y. Li, L. Hui // *Sci. Reports*. 2016. Vol. 6. Article number: 27411.

8. *Rini J.M., Esko J.D. Glycosyltransferases and glycan-processing enzymes* / Chapter 6 in book *Essentials of glycobiology*; Cold Spring Harbor (NY). Ed. A. Varki [et al.]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. P. 2015-2017.

УДК 616.36-2-022.6-036.12-53.2-097

Бобровицкая А.И., Захарова Л.А., Карачаева Е.С.

Государственная образовательная организация высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк, lubov65@mail.ru

Иммунологические нарушения показателей клеточного и гуморального звена иммунитета при хроническом вирусном гепатите В или С у детей

Изменение клеточного и гуморального звеньев иммунитета у детей в фазе ремиссии хронического вирусного гепатита В или С и носительстве HBsAg или HCV, позволяют определить особенности течения болезни, тяжесть воспалительного процесса в органах и системах с целью проведения адекватной профилактической терапии.

Ключевые слова: *дети, хронический гепатит, носительство, иммунитет.*

Bobrovitskaya A.I., Zakharova L.A., Karachaeva E.S.

State Educational Institution of Higher Professional Education «M. Gorky Donetsk National Medical University», Donetsk

Immunological disturbances of cellular and humoral line of immunity in chronic viral hepatitis B or C in children

Changes in the cellular and humoral links of immunity in children in the remission phase of chronic viral hepatitis B or C and the carrier of HBsAg or HCV make it possible to determine the features of the course of the disease, the

severity of the inflammatory process in organs and systems in order to conduct adequate preventive therapy.

Key words: *children, chronic hepatitis, carriage, immunity.*

Особенностью организма детей в неонатальном периоде является преобладание малодифференцированных клеток, лишенных специфичности реакций. Изменения клеточного звена иммунитета и клеточно-фагоцитарного потенциала организма отражают состояние компенсаторно-приспособительных механизмов у детей раннего возраста и обеспечивают возможность противоинойфекционной защиты [1]. Иммунологические реакции новорожденного и детей раннего возраста являются важнейшими адаптационными механизмами, обеспечивающими его существование во внешней среде. Плод и новорожденный реагируют на действие некоторых агентов выработкой антител еще до того, как их иммунная система достигнет полного развития [2].

Поэтому ребенок к моменту рождения обладает определенным спектром иммуноглобулинов различных классов и является также дополнительным тестом для характеристики адаптационных возможностей организма, особенно у детей от матерей, переболевших острым вирусным гепатитом В или С во время беременности, а также имеющих в анамнезе хронический вирусный гепатит В или С [3,4].

Цель работы: изучение клеточного и гуморального звеньев иммунитета при хронических вирусных гепатитах В или С у детей для решения вопроса дальнейшего мониторинга и проведения адекватной профилактической терапии.

Материалы и методы. Под наблюдением находились 144 ребенка с хроническим вирусным гепатитом В (45,8%), хроническим вирусным гепатитом С (26,38%); носительство HBsAg (20,82 %) и HCV (6,94 %). Изучены показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета при хронических вирусных гепатитах В или С у детей.

Исследование отвечало всем этическим требованиям, предъявляемым к научным работам, на что было получено разрешение этического комитета Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького.

Результаты и их обсуждение. В настоящее время ведется активное изучение патологии хронических вирусных гепатитов (ХВГВ) и (ХВГС) с клинико-иммунологических позиций. В основе патогенеза хронических вирусных гепатитов лежат глубокие нарушения иммунного ответа с дисбалансом количественного и качественного состава иммунокомпетентных клеток и нарушением их функциональной активности и клеточной кооперации, то есть регистрируются при-

знаки комбинированной иммунной недостаточности с нарушением функциональной активности иммунокомпетентных клеток и клеточной кооперации (дисбаланс хелперного и супрессорного звеньев иммунитета). Недостаток супрессоров усиливает выработку антител и образование иммунных комплексов, что вызывает аутоиммунные поражения.

Обобщение результатов анализа популяционного состава Т-лимфоцитов периферической крови у детей при хроническом вирусном гепатите В или С позволило выявить дисбаланс иммунной системы – хелперного и супрессорного звеньев иммунитета (табл. 1).

Таблица 1. Популяционный состав Т-лимфоцитов при вирусном гепатите В или С у детей (n=144, M±m)

Показатели	ХВГВ (n=85)	ХВГС (n=59)	Носительство HBsAg (n=20)	Носительство HCV (n=22)	Условно-здоровые (n=30)
CD3+	49,73±1,41*	51,32±1,23*	52,31±1,23*	53,12±1,11*	63,04±1,13
CD4+	28,02±0,81*	29,05±0,53*	30,41±0,31*	28,13±0,27*	33,03±1,7
CD8+	22,28±0,27*	20,37±0,71*	21,35±0,99*	19,93±0,76*	24,20±0,8
CD4+/CD8+	1,26±0,05*	1,42±0,08*	1,43±0,06*	1,41±0,04*	1,76±0,15

Примечание: достоверность различий по сравнению со здоровыми * – p < 0,05

Согласно данным таблицы 1, при хроническом вирусном гепатите В стадия ремиссии нами выявлено у всех детей снижение содержания зрелых CD3+ Т-лимфоцитов на 21,1%, CD4+ хелперных клеток – 15,2% цитотоксических CD8+ (супрессоров) – 7,9%, индекса CD4+/CD8+ на 28,4% по сравнению с показателями условно здоровых детей.

При хроническом вирусном гепатите С стадия ремиссии нами выявлено у всех детей также снижение содержания CD3+ (общего популяционного маркера Т-лимфоцитов) на 18,6%, CD4+ Т-лимфоцитов (хелперных клеток) – 12,05%, цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов (супрессоров) – 15,8%, индекса CD4+/CD8 – 15,2% (p<0,05). Наряду с уменьшением CD3+ отмечены изменения их иммунорегуляторных субпопуляций, проявляющиеся снижением Т-хелперов (CD4+) и цитотоксических лимфоцитов (CD8+).

Изучение иммунограммы у детей при носительстве HBsAg или HCV выявило снижение на 17,0% и 15,7% (CD3+); 7,9% и 14,8%

(CD4+); 11,7% и 17,6% (CD8+); 19,8% и 18,7% (индекса CD4+/CD8+). Снижение указанных показателей у детей более выражено при носительстве HCV.

Следовательно, у всех детей при хроническом вирусном гепатите В или С в стадии ремиссии и носительстве HBsAg или HCV нарушения Т-клеточного звена иммунитета выражаются изменениями как количественного, так и качественного состава Т-клеток. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови отражает сохранение существенного снижения содержания Т-лимфоцитов CD4 и CD8 на фоне дефицита общего количества зрелых Т-лимфоцитов (CD3), особенно при хроническом вирусном гепатите С и носительстве HCV, то есть при хронической вирусной HB – и HCV-инфекции CD4 Т-клеточный пролиферативный ответ на инфекционные агенты является слабым, а цитотоксический ответ Т-лимфоцитов (CD8) – недостаточный для их элиминации. Наличие гипосупрессорного варианта недостаточности Т-клеточного звена иммунитета у данных детей при суперинфицировании и фоновых заболеваниях способствует прогрессированию вторичной иммунной недостаточности и развитию осложнений специфического и неспецифического характера. Кроме этого недостаток супрессоров (CD8+) усиливает выработку антител и образование иммунных комплексов – создаются условия для развития аутоиммунной патологии.

Нами выявлена также существенная разница в состоянии иммунной системы у данных детей при изучении гуморального звена иммунитета -исследование содержания иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови (таблица 2).

Таблица 2. Спектр показателей В – системы иммунитета при вирусном гепатите В или С у детей (n=144, M±m)

Показатели	ХВГВ (n=85)	ХВГС (n=59)	Носитель- ство HBsAg (n=20)	Носитель- ство HCV (n=22)	Условно здоровые (n=30)
Ig A (г/л)	1,53±0,06*	1,59±0,08*	1,47±0,09**	1,42±0,07**	1,37±0,05
IgM (г/л)	1,06±0,07**	1,09±0,05**	0,89±0,06**	1,17±0,08*	0,94±0,13
Ig G (г/л)	12,8±0,14*	11,84±0,12*	13,19±0,09*	12,9±1,14*	9,80±0,76

Примечание: достоверность различий по сравнению со здоровыми * – p<0,05.

По данным табл. 2, спектр показателей В – системы иммунитета имеет разнонаправленность. При хроническом вирусном гепатите В в стадии ремиссии выявлено повышение содержания иммуноглобулинов IgA на 11,6%, IgM – 12,7%, IgG – 30,6%; при хроническом вирусном гепатите С на: 16,0%, 15,9% и 20,8% соответственно ($p < 0,05$). При носительстве HBsAg или HCV содержание IgA и IgM в периферической крови сохранялось на физиологическом уровне ($p > 0,05$). Однако при носительстве HCV содержание IgM в периферической крови превышало физиологический уровень на 24,5 %, что подтверждает присутствие воспалительного процесса в гепатоцитах ($p < 0,05$). Анализ иммунограммы выявил, что защита организма от инфекционного агента у всех детей, осуществлялась преимущественно иммуноглобулинами G (микроглобулинами), особенно при носительстве HBsAg или HCV – содержание IgG превышало физиологический уровень на 34,6 % (HBsAg) и 31,6 % (HCV) статистически достоверно ($p < 0,05$).

Заключение. Несмотря на удовлетворительное самочувствие у детей в фазе ремиссии хронического вирусного гепатита В или С и носительстве HBsAg или HCV, необходим тщательный сбор анамнеза, комплексное клиничко – лабораторное обследование, которые позволяют определить особенности течения болезни, тяжесть воспалительного процесса в органах и системах с целью проведения адекватной профилактической терапии. Использование неинвазивных методов для комплексной оценки общего реактивного потенциала организма (НЭК, КФП, ИЛП, АНО), процессов тканевой дегенерации и уровня эндогенной интоксикации (ЛИИ, ЛИИМ, РОН, ИРО, ИЛ/СОЭ, ИК, ЯИЭ), позволит расширить возможности получения информации о характере воспалительного процесса в гепатоцитах печени при хроническом вирусном гепатите В или С и носительстве HBsAg или HCV у детей. Эффективность клеточного и гуморального звеньев иммунитета при HB- и HCV-инфекции у детей ограничена, прежде всего, резистентностью вирусных вариантов к нейтрализации антителами, замедленным появлением и качеством вирус-специфических антител, низкой иммуногенностью протеинов HBsAg и HCV, а также низкими титрами антител. Длительное действие инфекционного антигена на иммунную систему организма является предпосылкой для развития аутоиммунных реакций, осложнений специфического и неспецифического характера, развитие фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. Объективная оценка клиничко-лабораторных параметров у всех детей при хроническом вирусном гепатите В или С стадия ремиссии и носительстве HBsAg и

НСV позволила выявить наличие воспалительного процесса в гепатоцитах минимальной активности в сочетании со вторичным иммунодефицитом, что требует мониторинга и проведения профилактической терапии в амбулаторных условиях.

Список литературы

1. Ушакова Р.А. Особенности течения гепатитов у детей первого года жизни / Ушакова Р.А. // Уральский медицинский журнал. 2012. № 1 (93). С. 128-133.
2. Турланов К.М., Современное состояние и проблемы клинко-лабораторных исследований вирусных гепатитов у детей / Турланов К.М., Рысулы М.Р., Мусаев А.Т., Маденов Н.Н., Ердаш Б.Е.// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013. № 4. С. 100-101.
3. Орлова А.В. Особенности течения хронического вирусного гепатита С у детей с различными механизмами инфицирования / Орлова А.В., Эмирова З.Ф., Тезикова И.В.// Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека Материалы III Всероссийской образовательно-научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием в рамках XIII областного фестиваля «Молодые ученые – развитию Ивановской области». Иваново, 2017. С. 329-331
4. Иноятова Ф.И. Влияние некоторых факторов на формирование течения хронического гепатита В у детей в семейных случаях/ Иноятова Ф.И., Абдуллаева Ф.Г., Иногамова Г.З., Валиева Н.К., Икрамова Н.А.// Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2016. Т. 61. № 4. С. 151-152.

УДК 612.064

*Бяловский Ю.Ю., Ракитина И.С.
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
Рязань
b_uu@mail.ru*

Показатели периферической крови при увеличенном сопротивлении дыханию

Динамика показателей периферической крови зависит от времени действия дополнительного респираторного сопротивления во время сеанса и от продолжительности курса активации резистивными нагрузками. У испытуемых с трехминутным и десятиминутным действием

резистивной нагрузки наблюдалась противоположная направленность изменений показателей периферической крови.

Ключевые слова: *периферическая кровь, дополнительное респираторное сопротивление.*

*Byalovsky Yu. Yu., Rakitina I.S.
FSBEI HE RyazSMU MON Russia
Ryazan*

Indicators of peripheral blood with increased resistance to breathing

The dynamics of peripheral blood indicators depends on the time of action of additional respiratory resistance during the session and on the duration of the course of activation by resistive loads. In subjects with a three-minute and ten-minute effect of a resistive load, the opposite direction of changes in peripheral blood parameters was observed.

Key words: *peripheral blood, additional respiratory resistance.*

Приоритетными направлениями деятельности медицины, являются повышение адаптационно-компенсаторных возможностей организма, выявление и устранение факторов риска развития дезадаптационных состояний и донозологических форм заболеваний, улучшение индивидуального качества жизни с целью сохранения и восстановления профессионального здоровья. Общая теория адаптационной медицины [1] позволяет приблизиться к выбору оптимальных воздействий факторов внешней среды исходя из механизмов приспособления целостного организма.

В последние годы все большее внимание исследователей уделяется развитию нового направления — формирования антистрессорных реакций и повышения устойчивости к экологически неблагоприятным факторам, которые в общем виде отражают методы и принципы активационной терапии. В фундаментальных исследованиях Е.Б.Квакиной и Л.Х.Гаркави создана мощная экспериментальная база и доказана эффективность активационной терапии применительно к сформировавшимся заболеваниям [2].

При нанесении различного рода раздражителей в зависимости от их силы включаются стресс-мобилизующие или стресс-лимитирующие системы [3]. Показано, что при включении слабых и средних по силе раздражителей запускаются стресс-лимитирующие (синтоксические) механизмы адаптации, при нанесении же сильных раздражителей активируются стресс-реализующие (кататоксические) механизмы адаптации [4]. Для выявления неспецифических адаптивных реакций при

применении дополнительных респираторных сопротивлений (ДРС), нами изучались такие маркеры общеадаптационных механизмов как состояние клеточного состава периферической крови [2].

Цель исследования – изучить изменения клеточного состава периферической крови при применении дополнительных респираторных сопротивлений.

Исследование проводилось на добровольцах (18 человек), в возрасте от 18 до 27 лет обоего пола. Величина ДРС нормировалась исходя из максимального значения внутриротового давления во время первого нагруженного вдоха при выполнении пробы Мюллера. Испытуемые были разделены на две группы: у представителей первой группы, ДРС величиной $20\% P_{\text{max}}_{\text{insp}}$ предъявлялось в течение 3-х минут 3 раза в день. Вторая группа испытуемых получала ту же величину дыхательной нагрузки, но в течение 10 минут 3 раза в день. Длительность курса активационной терапии с помощью ДРС составляла 10 дней. Контрольная группа включала 16 человек.

Состояние неспецифических адаптационных механизмов оценивалось по маркерам, предложенным Е.Б.Квакиной и Л.Х.Гаркави [2] с использованием клеточного анализа периферической крови. Капиллярная кровь из пальца забиралась дважды: до применения ДРС и сразу по его завершении. Клеточный состав крови и концентрацию гемоглобина определяли с помощью гематологического анализатора Avis GA-60. Материал обработан с использованием автоматизированного пакета «Statgraphics 3,6».

В табл. 1. приведена динамика показателей крови испытуемых терапевтического профиля при реализации дыхательных тренажеров ДРС с разными временными режимами. Основные различия представленных показателей определялись в группах испытуемых с 3-х минутным и 10-ти минутным режимом действия ДРС. Так, у испытуемых, использовавших ДРС в течение 3 минут наблюдалось достоверное уменьшение ($pd < 0,01$) количества лейкоцитов периферической крови, падение концентрации эозинофилов ($pd < 0,01$), уменьшение моноцитов ($pd < 0,01$) и рост лимфоцитов ($pd < 0,05$). Согласно [2], указанные изменения характерны для активации стресс-лимитирующих или антистрессорных механизмов.

Десятидневные воздействия по 3 минуты ДРС $20\% P_{\text{max}}_{\text{insp}}$ приводили к еще более заметной активации стресс-лимитирующих механизмов. После 10 дней тренировок по окончании действия нагрузки обнаруживалось уменьшение количества сегментоядерных лейкоцитов ($pd < 0,05$) на фоне выраженного снижения общего содержания лейкоцитов ($pd < 0,01$).

Таблица 1. Показатели периферической крови испытуемых до и после воздействия ДРС 20% Pmтаx^{10pr}

Показатели крови	Тренажер 3 минуты в первый день		Тренажер 3 минуты на десятый день		Тренажер 10 минут на десятый день	
	Исходный фон	После нагрузки	Исходный фон	После нагрузки	Исходный фон	После нагрузки
Эритроциты, 1012/л	4,38±0,12	4,13±0,14	4,36±0,11	4,11±0,14	4,38±0,11	4,62±0,18
Гемоглобин, г/л	140,83±3,37	137,56±4,18	142,12±3,41	136,23±3,25	143,1±5,02	153,83±3,77*
Лейкоциты, 106/л	6,43±0,97	5,11±0,73*	6,21±0,61	4,92±0,77 **	5,93±0,88	6,73±0,90*
СОЭ, мм/ч	12,16±1,79	10,14±1,90	12,22±1,43	11,32±1,81	13,72±1,43	15,11±1,92
Эозинофилы, %	2,5±0,42	1,13±0,22 **	2,8±0,50	2,1±0,32	2,9±0,48	3,2±0,52
Палочкоядерные лейкоциты, %	0,55±0,21	0,98±0,19*	0,42±0,24	0,85±0,21*	0,52±0,22	2,4±0,89**
Сегментоядерные лейкоциты, %	57,83±2,99	54,13±2,31	59,44±2,71	53,13±2,43*	55,33±2,45	53,22±2,22
Лимфоциты, %	30,5±2,99	32,2±2,34	29,2±2,12	33,2±2,17*	31,5±2,99	27,5±2,42*
Моноциты, %	8,66±1,20	4,6±1,02**	7,60±1,32	6,21±1,74	6,17±0,76	8,66±1,09*

Примечание: $pd < 0,05$ - *, $pd < 0,01$ - **

Противоположную направленность изменения показателей периферической крови демонстрировала группа испытуемых с 10-минутной экспозицией действия ДРС. Это выразалось в увеличении содержания эритроцитов ($pd < 0,05$), концентрации гемоглобина ($pd < 0,05$), росте количества лейкоцитов ($pd < 0,05$), палочкоядерных лейкоцитов ($pd < 0,01$), моноцитов ($pd < 0,05$) и падении содержания лимфоцитов ($pd < 0,05$). Подобные изменения [2] трактуют как преобладание стресс-реализующих механизмов.

На рис. 1 представлены относительные изменения показателей крови испытуемых при разных временных режимах действия ДРС. На представленных диаграммах отчетливо виден противоположный (реципрокный) характер возникающих изменений при 3- и 10-минутной экспозиции действия ДРС.

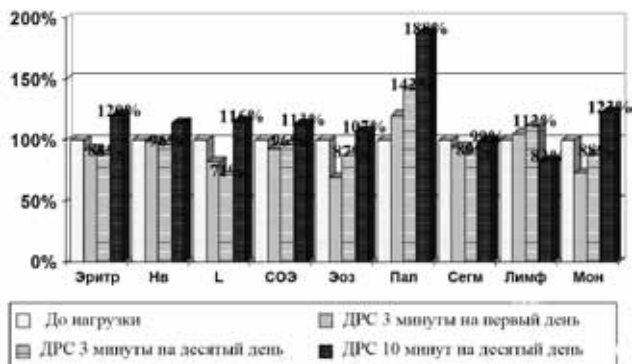


Рис. 1. Относительные сдвиги (в %) показателей периферической крови испытуемых при разных временных режимах действия дополнительного респираторного сопротивления

Противоположная направленность гормональных, иммунологических, гемостатических, антиоксидантных механизмов, возникающих после действия разных величин ДРС заставляет предполагать о том, что существуют реципрокные механизмы адаптации к факторам среды (стресс-лимитирующие и стресс-реализующие системы). Данные литературы показывают, что полезные приспособительные результаты первой группы (часто называемые гомеостатическими) характеризуются стремлением организма к сохранению старых адаптивных программ, гипостеническим типом реагирования, пассивным стилем поведения, трофотропными вегетативными реакциями, выбором конформного пути, относительно медленным разворачиванием адаптивных механизмов, автоматическим типом и децентрализацией

управления, минимизацией физиологических функций [5]. Вторая группа результатов – противоположная по регуляторным, физиологическим и поведенческим проявлениям: гомеокинетическая (гетеростатическая), с активной сменой психофизиологических адаптивных программ, гиперстеническим типом реагирования, активным стилем поведения, эрготропными вегетативными реакциями, поиском адаптогенных воздействий, максимализацией физиологических эффектов, напряженным типом и централизацией управления. Для достижения полезных приспособительных результатов каждая из антагонистически организованных функциональных систем формирует «команды», состоящие из структур и механизмов, которые могут выступать надежными маркерами текущего функционального состояния [6].

Таким образом, динамика показателей крови в значительной степени зависит от времени действия ДРС во время сеанса и в меньшей степени – от продолжительности курса активации резистивными нагрузками. Трехминутная экспозиция вызывала достоверное уменьшение количества лейкоцитов периферической крови, падение концентрации эозинофилов, уменьшение моноцитов и рост лимфоцитов. Десятиминутное действие ДРС стимулировало увеличение содержания эритроцитов, повышение концентрации гемоглобина, рост количества лейкоцитов, палочкоядерных лейкоцитов, моноцитов и падение содержания лимфоцитов. Десятидневные трехминутные воздействия ДРС приводили к еще более заметной активации стресс-лимитирующих механизмов: после 10 дней тренировок по окончании действия нагрузки обнаруживалось уменьшение количества сегментоядерных лейкоцитов на фоне выраженного снижения общего содержания лейкоцитов.

Список литературы

1. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: концепция долговременной адаптации. М.: Дело, 1993. -138 с.
2. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов н/Д., Изд. третье, доп., 1990. -223 с.
3. Морозов В.Н., Гладких П.Г., Хадарцева К.А. Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание, 2016. № 1. -С.241-252.
4. Преображенский В.Н., Ушаков И.Б., Лядов К.В. Активационная терапия в системе медицинской реабилитации лиц опасных профессий. М.: «Паритет Граф», 2000. 320 с.

5. Шлык Н.И. Сердечный ритм и тип регуляции у детей, подростков и спортсменов. Ижевск: Изд-во «Удмуртский университет», 2009. 259 с.

6. Бяловский Ю.Ю., Булатецкий С.В., Глушкова Е.П. Системная организация неспецифических механизмов адаптации в восстановительной медицине. Воронеж, ООО «Издательство РИТМ», 2017. 406 с.

УДК 616

*Великанова Л.И., Шафигуллина З.Р., Ворохобина Н.В.,
Стрельникова Е.Г., Лисицын А.А.*
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И. Мечникова» Минздрава РФ
Санкт-Петербург
Velikanova46@gmail.com

Сравнительный селективный забор крови из надпочечниковых вен у больных с первичным гиперальдостеронизмом по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии

В работе получены дополнительные критерии латерализации и селективности при определении предшественников альдостерона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии во время проведения сравнительного селективного забора крови из надпочечниковых вен у пациентов с различными формами первичного гиперальдостеронизма. Полученные данные увеличивают точность дифференциальной диагностики альдостерон-продуцирующей аденомы и идиопатического гиперальдостеронизма.

Ключевые слова: *сравнительный селективный забор крови из надпочечниковых вен, высокоэффективная жидкостная хроматография, предшественники альдостерона, первичный гиперальдостеронизм.*

*Velikanova L.I., Shafigullina Z.R., Vorokhobina N.V.,
Strelnikova E.G., Lisitsin A.A.,
FSBEI HE «North-Western State Medical University
named after I.I. Mechnikov», St. Petersburg*

Comparative selective blood sampling from adrenal veins in patients with primary hyperaldosteronism according to high-performance liquid chromatography

Additional criteria for lateralization and selectivity were obtained in the determination of aldosterone precursors by high-performance liquid chromatography during comparative selective blood sampling from the adrenal

veins in patients with various forms of primary hyperaldosteronism. The data obtained increase the accuracy of the differential diagnosis of aldosterone-producing adenoma and idiopathic hyperaldosteronism.

Key words: *comparative selective blood sampling from the adrenal veins, high-performance liquid chromatography, aldosterone precursors, primary hyperaldosteronism.*

Введение. Первичный гиперальдостеронизм (ПГА) является одной из причин эндокринной гипертензии и наблюдается в 7-15% случаев среди пациентов с артериальной гипертензией (АГ) [1]. Альдостерон-продуцирующая аденома (АПА) составляет около 35%, идиопатический гиперальдостеронизм (ИГА), обусловленный двухсторонней диффузной или диффузно-узелковой гиперплазией коры надпочечников – 60% среди больных с ПГА. Верификация типа ПГА является определяющим фактором для выбора лечения данной категории больных. В настоящее время для постановки диагноза используются клинические признаки, лабораторные и визуализирующие методы диагностики [2]. Алгоритм диагностики состоит из скрининговых тестов (определение концентрации калия и альдостерона в сыворотке крови, альдостерон-ренинового соотношения) и подтверждающих тестов (пробы с физиологическим раствором или флудрокортизоном, вапотеном), а также данных визуализирующих методов диагностики [2,3]. Дифференциальная диагностика АПА и ИГА на основании КТ-диагностики и методов иммуноанализа, имеющих относительно низкую чувствительность и специфичность, нередко приводит к неправильному диагнозу и к неоправданным адреналэктомиям, составляющим около 14,6% [3]. В связи с этим пациентам рекомендуется выполнять сравнительный селективный забор крови из центральных вен надпочечников (ССВЗК) для уточнения источника гиперпродукции альдостерона [4-7]. В настоящее время, по мнению большинства специалистов, ССВЗК является «золотым стандартом» в проведении дифференциальной диагностики между АПА и ИГА [8]. Однако в настоящее время существуют определенные трудности, связанные с отсутствием общепризнанного стандарта проведения исследования, единого индекса селективности и критерия латерализации, что приводит к сложностям в интерпретации результатов и установления диагноза [8]. Кроме того, ССВЗК является технически сложной процедурой, имеющей высокий процент неудачных результатов. Поиск критериев для оценки успешности процедуры и надежности латерализации является чрезвычайно актуальной задачей. Ряд исследователей определяли предшественники

альдостерона при проведении ССВЗК для разработки дополнительных критериев латерализации [9]. Таким образом, представляется актуальным определение предшественников альдостерона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при проведении ССВЗК в сочетании с методами иммуноанализа для увеличения точности диагностики АПА.

Материалы и методы. ССВЗК проведен у 54 больных с ПГА в возрасте 54 (46-62) лет. 27 здоровых лиц соответствующего возраста составили группу контроля (ГК). Определяли уровни кортизола и альдостерона (АЛД) в сыворотке крови из левой надпочечниковой вены (ЛНВ) и правой надпочечниковой вены (ПНВ), уровень кортизола в нижней полой вене методами иммуноанализа. Методом ВЭЖХ изучали содержание кортизола (F), 11-дезоксикортизола (S), кортикостерона (B), 11-дезоксикортикостерона (DOC), 11-дегидрокортикостерона (A) и 18-гидроксикортикостерон (18-ОНВ) в сыворотке крови. Данные показатели исследовали до и во время ССВЗК из ПНВ и ЛНВ. Коэффициенты селективности и латерализации рассчитывали по общепринятым формулам и по данным ВЭЖХ. Использовали коэффициент селективности 3:1. При градиенте латерализации (ГЛ) более 2 была диагностирована АПА, менее 2 — двухстороннее поражение надпочечников. До проведения ССВЗК рассчитывали альдостерон-рениновое соотношение (АРС) и проводили пробу с физиологическим раствором (ПФР). Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета STATISTICA for WINDOWS (версия 10). Использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Количественные показатели представляли в виде $Me (Q_{25}-Q_{75})$.

Результаты. На основании комплексного исследования пациенты с ПГА были разделены на 2 группы: 34 пациента — с АПА и 20 пациентов — с ИГА. У пациентов с АПА и ИГА методом ИФА получено повышение уровня АЛД, снижение ренина в сыворотке крови и увеличение альдостерон-ренинового соотношения (АРС) в сравнении с ГК (табл. 1). У больных с АПА в сравнении с показателями пациентов с ИГА отмечено снижение уровня ренина в сыворотке крови, повышение АРС (>100), уровня альдостерона в сыворотке крови после ПФР (>120 пг/мл) и ГЛ ($>2,4$) (табл. 1). Однако уровень альдостерона у пациентов с АПА не отличался от больных ИГА ($p=0,2$). Уровень ренина меньше 3,0 пг/мл и уровень альдостерона после ПФР больше 120 пг/мл были получены у 5 больных с ИГА. Полученные данные дают основание для поиска дополнительных критериев дифференциальной диагностики АПА и ИГА.

Таблица 1. Гормональные показатели системы ренин-альдостерон и результаты диагностических тестов у больных с гиперальдостеронизмом, полученные методом иммуноферментного анализа

Показатель	Ме (Q25–Q75)		
	Группа контроля n=27	Пациенты с АПА n=34	Пациенты с ИГА n=20
Альдостерон, пг/мл	67,5 (45,4 – 90,5)	415 (228-597)*	229 (168-397)* p=0,2
Ренин, пг/мл	10,1 (7,0 – 16,0)	1,5 (1,0-3,0)*	3,0 (2,0-5,5)* p=0,02
Альдостерон-рениновое соотношение (АРС)	4,7 (3,3 – 12,7)	177 (107-317)*	71 (57-101)* p=0,005
Альдостерон после пробы с физиологическим раствором, пг/мл		184 (120-381)	122 (98-171) p=0,03
Градиент латерализации		3,2 (2,4-10,6)	0,9 (0,7-1,6) p=0,0001

Примечание: * – $p < 0,0001$ – достоверность различий показателей пациентов с АПА и ИГА по сравнению с показателями группы контроля. p – достоверность различий показателей пациентов АПА и ИГА.

По данным ВЭЖХ у больных с АПА были повышены уровни кортизола, кортикостерона и 18-ОНВ в сыворотке крови, соотношения F/E и В/А, увеличена экскреция мочой 18-ОНВ в сравнении с ГК (табл. 2 и 3). У пациентов с ИГА данные показатели не отличались от ГК.

У больных с АПА при проведении ССЗНВ по данным ВЭЖХ получены дополнительные критерии латерализации: повышение уровней В более чем в 4 раза, ДОС и 18-ОНВ более чем в 2 раза, увеличение соотношений В/Ф более чем в 1,8, 18-ОНВ/Ф и ДОС / Ф более чем в 1,3 раза в крови доминирующей вены в сравнении с контрлатеральной. Данные показатели были выше в сравнении с показателями больных ИГА (табл. 4). У 7 больных с АПА с ГЛ<2 (серая зона) были сохранены основные критерии латерализации, полученные методом ВЭЖХ: увеличение уровня 18-ОНВ более чем в 2 раза [5,5 (2,1-7,9)] и соотношения 18-ОНВ/Ф более чем в 1,3 раза [3,6 (1,3-5,4)] в крови доминирующей вены в сравнении с контрлатеральной.

Таблица 2. Содержание кортикостероидов в сыворотке крови у пациентов с альдостерон продуцирующей аденомой по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии

Показатели	Me (Q25–Q75)		P
	Группа контроля n=27	Пациенты с АПА n=34	
Кортизол (F), нг/мл	83,2 (71,3 – 96,0)	100,9 (79,8 – 140,7)	0,006
Кортизон (E), нг/мл	18,1 (16,7 – 20,8)	13,2 (8,3 – 18,2)	0,03
11-дезоксикортизол (S), нг/мл	1,4 (0,4 – 1,9)	0,5 (0,4 – 1,4)	0,94
18-гидроксикортикостерон (18-ОНВ), нг/мл	1,0 (0,5 – 1,2)	2,4 (1,8 – 3,8)	0,0001
Кортикостерон (B), нг/мл	2,0 (2,0 – 2,8)	4,1 (2,1 – 5,8)	0,003
11-дегидрокортикостерон (A), нг/мл	1,8 (1,5 – 2,3)	2,0 (1,0 – 3,2)	0,39
11-дезоксикортикостерон (DOC), нг/мл	1,2 (1,0 – 1,4)	0,9 (0,5 – 2,2)	0,66
Соотношение кортизол/кортизон	4,3 (3,9 – 5,2)	9,1 (6,1 – 11,1)	0,0002
Соотношение B/A	1,3 (0,8 – 1,7)	2,8 (1,2 – 3,9)	0,01

Примечание: p – достоверность различий показателей пациентов с альдостерон-продуцирующей аденомой (АПА) по сравнению с показателями группы контроля

Таблица 3. Содержание 18-гидроксикортикостерона в сыворотке крови и моче при различных формах первичного гиперальдостеронизма по данным ВЭЖХ

Показатели	Me (Q25–Q75)		P
	АПА, n=34	ИГА, n=20	
18-ОН-кортикостерон (18-ОНВ), нг/мл	2,4 (1,8-3,8)	0,9 (0,5-1,3)	0,01
18-ОН-кортикостерон (U18-ОНВ), мкг/24 ч	84,4 (46,1-157)	20,4 (16,7-21,2)	0,004

p – достоверность различий показателей пациентов с альдостерон-продуцирующей аденомой (АПА) с показателями пациентов с идиопатическим гиперальдостеронизмом (ИГА)

Таблица 4. Верификация альдостерон-продуцирующих аденом надпочечника (АПА) по коэффициентам латерализации при сравнительном селективном заборе крови из надпочечниковых вен по данным ВЭЖХ

Показатели	Me (Q25–Q75)		p
	АПА, n=34	ИГА, n=20	
Кортикостерон-1 / кортикостерон-2 (В-1 / В-2)	7,8 (4,4-18,9)	2,2 (1,6-2,5)	0,01
11-дезоксикортикостерон-1 / 11-дезоксикортикостерон-2 (DOC-1 / DOC-2)	4,0 (2,0-12,6)	1,0 (0,8-1,9)	0,015
18-ОН-кортикостерон-1 / 18-ОН-кортикостерон-2 (18-ОНВ-1/18-ОНВ-2)	3,9 (2,2-14,2)	1,0 (0,5-2,1)	0,005
В/Ф-1 / В/Ф-2	3,7 (1,8-5,5)	1,3 (1,0-1,4)	0,02
18-ОНВ/Ф- 1 / 18-ОНВ/Ф -2	3,2 (1,3-5,4)	0,4 (0,2-0,6)	0,0003
DOC /Ф-1 / DOC/Ф-2	4,0 (1,3-12,6)	1,0 (0,8-1,1)	0,015

p – достоверность различий показателей пациентов с альдостерон продуцирующей аденомой (АПА) с показателями пациентов с идиопатическим гиперальдостеронизмом (ИГА). 1 – доминирующая вена, 2 – контрлатеральная вена.

Проведен расчет коэффициента селективности (Кс) по данным ВЭЖХ: соотношения уровней кортикостерона в доминирующей вене (Вд) и в контрлатеральной вене (Вк) к его фоновому уровню (Вф). Соотношение Вд/Вф у больных АПА было больше 9,0, у пациентов с ИГА – больше 5,0, соотношение Вк/Вф было больше 3,0 у больных АПА и ИГА (табл. 5). У 8 больных с АПА с Кс <3,0 соотношения Вд/Вф 13,5 (4,5-35,9) и Вк/Вф 6,0 (4,1-16,9) были больше 4,0. Таким образом, полученные дополнительные критерии латерализации и селективности методом ВЭЖХ увеличивают точность диагностики АПА.

Таблица 5. Коэффициенты селективности у больных с альдостерон-продуцирующей аденомой и идиопатическим гиперальдостеронизмом по данным ВЭЖХ

Показатели селективности	Me (Q25–Q75)	
	АПА, n=34	ИГА, n=20
Кортикостерон-д / кортикостерон-ф (Вд /Вф)	25,9 (9,9-114,3)	37,6 (5,2-53,6)
Кортикостерон-к / кортикостерон-ф (Вк /Вф)	5,5 (3,2-21,5)	5,9 (3,4 -20,5)

д – доминирующая вена, к – контрлатеральная вена, ф – фон

Заключение. Для подтверждения латерализации во время проведения ССЗВК кроме определения соотношения альдостерон/кортизол методами иммуноанализа предложено определять уровни 18-ОНВ, ДОС и В, соотношения 18-ОНВ/Ф, ДОС/Ф и В/Ф в крови ПНВ и ЛНВ по данным ВЭЖХ. Повышение уровней кортикостерона более чем в 4 раза, ДОС и 18-ОНВ более чем в 2 раза, увеличение соотношений В/Ф более чем в 1,8 раза, 18-ОНВ/Ф и ДОС / Ф более чем в 1,3 раза в крови доминирующей вены в сравнении с контрлатеральной являются дополнительными критериями в дифференциальной диагностике больных АПА и ИГА. Соотношения Вд/Вф больше 5,0 и Вк/Вф больше 3,0 являются дополнительными критериями селективности по данным ВЭЖХ у больных с АПА и ИГА. Полученные данные определения уровней предшественников альдостерона в сыворотке крови методом ВЭЖХ при проведении ССЗВК увеличивают точность дифференциальной диагностики АПА и ИГА.

Список литературы

1. Buffolo F., Monticone S., Williams T.A., Rossato D., Burrello J., Tetti M., Veglio F., Mulatero P., *Subtype Diagnosis of Primary Aldosteronism: Is Adrenal Vein Sampling Always Necessary? *Int J Mol Sci.* 2017. 18(4): P.848.
2. Song Y., Yang S., He W., Hu J., Cheng Q., Wang Y., Luo T., Ma L., Zhen Q., Zhang S., Mei M., Wang Z., Qing H. Brummer D., Peng B., Li Q. Confirmatory Tests for the Diagnosis of Primary Aldosteronism. *Hypertension.* 2018;71 P.118–124
3. Kempers MJ, Lenders JW, van Outheusden L, van der Wilt GJ, Schultze Kool LJ, Hermus AR, Deinum J. Systematic review: diagnostic procedures to differentiate unilateral from bilateral adrenal abnormality in primary aldosteronism. *Ann Intern Med.* 2009; 151 P.329–337
4. Rossi G.P., Auchus R.J., Brown M. et al., «An expert consensus statement on use of adrenal vein sampling for the subtyping of primary aldosteronism,» *Hypertension*, 2014.vol. 63, no. 1, P.151–160.
5. Jakobsson H., Farmaki K., Sakinis A., Ehn O., Johannsson G., Oskar Ragnarsson O. Adrenal venous sampling: the learning curve of a single interventionalist with 282 consecutive procedures. *Diagn Interv Radiol.* 2018 Mar; 24(2): P.89–93
6. Treistman N., Moraes A.B., Cozzolino S., Teixeira P.F.S, Neto L.V. Adrenal Venous Sampling in Primary Aldosteronism: The Usefulness of Contralateral Suppression Index. *Case report in medicine.* 2019. P.1–4
7. Vonend O., Ockenfels N., Gao X. et al., «Adrenal venous sampling: evaluation of the German Conn's registry,» *Hypertension.* 2011.V.57, no. 5, P. 990–995

8. Deinum J., Prejbisz A., Lenders J.W.M., Wilt G.J. Adrenal Vein Sampling Is the Preferred Method to Select Patients With Primary Aldosteronism for Adrenalectomy Hypertension. 2018;71:P.10–14

9. Реброва Д.В., Ворохобина Н.В., Баранов В.Л., Великанова Л.И. Способ дифференциальной диагностики основных форм первичного гиперальдостеронизма с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии // Артериальная гипертензия. 2018– Т.23. №3. С.212 – 223.

УДК 617.7

*Владимирова Ю.В.
ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н.Бурденко
Минздрава России
Воронеж
yul9952009@ya.ru*

Клинико-лабораторные параллели у пациентов с ПЭВР при различных видах катаракт

В настоящее время, несмотря на совершенствование технологии экстракции катаракты с имплантацией искусственного хрусталика, частота послеоперационных осложнений воспалительного характера остается достаточно высокой. Если раньше основной причиной осложненного течения послеоперационного периода была неадекватная хирургическая травма и токсическое действие материалов ИОЛ, то сегодня ведущая роль принадлежит воспалительным реакциям, которые наглядно демонстрируют наличие дисбаланса системы антиоксидантной защиты в ранние сроки развития окислительного стресса. На дисбаланс антиоксидантной системы оказывает влияние, помимо внешней радиации (ультрафиолет, интенсивный видимый свет) существенно стимулирующей образование активных форм кислорода, другие патологические состояния, а именно, возрастные изменения. Целью работы явилась оценка выраженности ПЭВР у пациентов с проведенной экстракцией осложнённой диабетической катаракты, а также эффективности предоперационной подготовки для профилактики интра- и послеоперационных осложнений при экстракции осложнённой катаракты, изучение состояния антиоксидантной системы у пациентов с осложнённой диабетической катарактой.

Ключевые слова: катаракта, ПЭВР, пероксиредоксин 6, антиоксиданты.

Clinical and laboratory parallels in patients with peir in various types of cataracts

Key words: *cataract, PEVR, peroxiredoxin 6, antioxidants.*

Введение. Несмотря на совершенствование технологии экстракции катаракты с имплантацией искусственного хрусталика, частота послеоперационных осложнений воспалительного характера остается достаточно высокой [1–8]. Ряд авторов указывает на частоту развития послеоперационной экссудативной реакции от 1,9% до 37,8% в зависимости от этиологии катаракты [6, 9–20].

Операционная травма в данном случае может рассматриваться как провоцирующий воспаление фактор. Чем сильнее провоцирующий фактор, тем большей интенсивности и длительности окажется биологический сигнал, включающий механизмы воспаления.

О роли системных аутоиммунных реакций в развитии осложнений воспалительного характера у больных с артрафакией в ранние сроки после операции может свидетельствовать повышенный титр антител к нативной и денатурированной дезоксирибонуклеиновой кислоте в крови и значительное увеличение концентрации.

Из вышеизложенного следует, что послеоперационное течение и степень выраженности ПЭВР у пациентов, которым выполнена ФЭК с имплантацией ИОЛ, находится в прямой зависимости от состояния иммунологической реактивности организма.

Образование избыточного количества ЦИК средне- и низкомолекулярных масс в результате экстракции катаракты с имплантацией ИОЛ сопровождается развитием внутриглазной воспалительной реакции. Установлено, что пероксиредоксин VI, принадлежащий к семейству тиол-специфичных белков имеет в своем составе домен, способный защищать белки от разрушения активными формами кислорода, подобно полноразмерному ферменту. Соответственно, снижение Пероксиредоксина-6 в слезной жидкости может приводить к послеоперационным осложнениям экстракции катаракты.

Цель. Оценка выраженности ПЭВР у пациентов с проведенной экстракцией осложнённой диабетической катаракты, а также эффективности предоперационной подготовки для профилактики интра- и послеоперационных осложнений при экстракции осложнённой ката-

ракты, изучение состояния антиоксидантной системы у пациентов с осложненной диабетической катарактой.

Материалы и методы. Были проанализированы результаты обследований 100 пациентов (100 глаз), что составило 10% больных с экссудативно-воспалительными осложнениями в раннем послеоперационном периоде (общее число обследованных – 1000 человек). Среди обследованных было 42% мужчин (42) и 58% женщин (58). Средний возраст пациентов составил 64,1 лет. Пациенты были поделены на равные группы. Первую группу составили 50 пациентов с возрастной катарактой, в возрасте от 68 до 85 лет. Вторую – такое же количество (50) больных с диабетической катарактой, средний возраст – $59,4 \pm 1,2$ лет. Группу контроля составили 25 здоровых лиц.

Для оценки выраженности экссудативной реакции были использованы критерии согласно рекомендациям С.Н.Федорова, Э.В.Егоровой (1985) и D.Ven Ezra с соавт. (1991), Федоров С.Н., Егорова Э.В. Ошибки и осложнения при имплантации искусственного хрусталика.- М.: Медицина.-1992.-174-175 с.

Оценивали 3 компонента:

Реакцию роговицы;

реакцию со стороны сосудистого тракта;

реакцию стекловидного тела.

Каждый компонент оценивали по бальной шкале.

На основании математической суммы баллов определялась тяжесть течения ПЭВР.

Определение степени тяжести ПЭВР: I степень – 6-10 баллов, II степень – 11-17 баллов, III степень – 18-23 баллов.

Методы клинического обследования включали сбор жалоб, анамнеза, консультации терапевта, эндокринолога, оториноларинголога, стоматолога.

Офтальмологическое обследование проводилось по общепринятым методикам – остроту зрения определяли с помощью проектора знаков «Nidek» без коррекции, отдельно для каждого глаза, начиная с лучшего. После уточнения рефракции пациента на автоматическом кератометре-рефрактометре NidekARK-730, подбиралась оптимальная коррекция на фороптере Nidek. Периметрия производилась с помощью сферо-периметра Carl Zeiss и компьютерного периметра NidekMedmontM – 700, биомикроскопия – с помощью щелевой лампы NidekSL – 1600, тонометрия на бесконтактном тонометре – NidekNT – 2000, офтальмоскопия осуществлялась при использовании прямого офтальмоскопа HeineBETA 200. При необходимости для детального исследования диска зрительного нерва и макулярной

области проводилось исследование заднего отрезка с помощью шелевой лампы с использованием высокодиптрийной линзы VOLK +60D. А-сканирование – на А-скане Ultrasonik, В-сканирование – на В-сканере NidekEchoScanUS – 3300. Сила интраокулярной линзы рассчитывалась с использованием программы IOLcalculation. Диагностика комплекса этиологических факторов, приводящих к развитию метаболических нарушений, осуществлялась на основании выявления изменения белкового состава слезы пациента до и после хирургического лечения.

Забор слезной жидкости в объеме 0,1 мл осуществлялся без дополнительной стимуляции с помощью одноразовой стерильной полимерной канюли (производство ЭТП МНТК Микрохирургии глаза), которая помещалась в нижний свод конъюнктивного мешка.

Слезная жидкость замораживалась сразу после взятия при -200С и хранилась без повторного размораживания не более 14 дней. Для исследования белкового состава слезы, был проведен PAAG электрофорез в присутствии SDS образцов слезы до и после лечения, средняя концентрация белка в пробах определялась спектрофотометрически с использованием спектрофотометра Nano-Drop 1000, Western – блот, для дальнейшего иммуноферментного анализа присутствия пептидов, белков и фрагментов белков в биологических жидкостях глаза, мажорные белки слезы, жидкости передней камеры, стекловидного тела, субретинальной жидкости, фрагментов тканей глаза анализировали методом MALDI-TOF – триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле, надгелевый раствор использовался для получения MALDI-масс-спектров. Идентификация белков осуществлялась при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Определение уровня экспрессии пероксиредоксина 6 определялся после тщательного анализа данных, полученных в результате спектрофотометрии, в котором был представлен суммарный уровень экспрессии ферментов-антиоксидантов и уровень экспрессии, приходящийся на все антиоксиданты, кроме пероксиредоксина 6.

В качестве условной нормы использовались данные анализа слезной жидкости людей без глазной патологии (группа контроля). Сущность метода прогнозирования результатов факоэмульсификации катаракты была основана на определении уровня защиты от окислительного стресса, заключающегося в том, что в дооперационный период в слезной жидкости определяют присутствие маркера возрастных изменений хрусталика – активного пероксиредоксина 6 и/или фрагментов его распада. При наличии в слезной жидкости активного пероксиредоксина 6 и/или фрагментов его распада диагности-

ровалась возрастная катаракта. При отсутствии в слезной жидкости активного пероксиредоксина 6 и/или фрагментов его распада подтверждается диагноз катаракты, вызванной изменениями хрусталика в ответ на фоновые расстройства метаболизма, например- сахарным диабетом. Катаракта при этом считалась диабетической. В послеоперационном периоде применяли патогенетическую терапию фоновых расстройств метаболизма. Использование метода позволяли определить антиоксидантный статус слезы до и после проведения ФЭК – тем самым определить прогноз осложнений, повысить эффективность лечения послеоперационных эксудативно-воспалительных осложнений.

Для статистической обработки результатов исследования был использован пакет прикладных программ Excel 2016 фирмы Microsoft Office. для персонального компьютера в системе Windows 10. В качестве порогового уровня статистической значимости было принято значение 0,05.

Полученные результаты интерпретировались следующим образом.

- Если $p > 0,05$, то нулевая гипотеза об отсутствии различий групп по изучаемому признаку не отклонялась.
- Если $p < 0,05$, то нулевая гипотеза отклонялась и принимается альтернативная гипотеза о существовании различий групп по изучаемому признаку.

Результаты исследования. Были изучены параметры антиоксидантной защиты органа зрения при определении фрагментов пероксиредоксина 6 в слезе пациентов I группы до лечения. У пациентов первой группы диагностирован исходно повышенный уровень содержания белка, который в 2,9 раза превышал значения группы контроля (7,93 и 2,66, соответственно). После хирургического лечения возрастной катаракты содержание белка достоверно не увеличилось, что свидетельствует о постоянстве протеомного статуса слезы пациентов I-й группы.

Были определены фрагменты пероксиредоксина 6 в слезе пациентов первой группы, что соответствует признакам наличия системы антиоксидантной защиты у возрастных пациентов, причем степень этой защиты – т.е. уровень экспрессии пероксиредоксина 6 различался внутри группы, была выявлена прямопропорциональная зависимость между уровнем экспрессии пероксиредоксина 6 и степенью зрелости ядра хрусталика.

После проведения хирургического лечения установлено увеличение уровня экспрессии пероксиредоксина 6, что почти в 2 раза больше концентрации маркера до операции, следовательно, исходное постоянство белкового состава слезы пациентов старше 60 лет связано с

достаточным резервом антиоксидантного статуса, который обеспечивает нормальное течение послеоперационного периода в группе возрастных катаракт. Можно утверждать, что наблюдается постоянство белкового состава слезы у пациентов с одной и той же клинической формой возрастной катаракты вне зависимости от стадии ее развития.

У пациентов второй группы доказано наличие достоверных **различий** концентрации белка слезы внутри группы. Подтверждено различие содержания белка слезы у пациентов с диабетической катарактой в зависимости от клинической картины полной или неполной диабетической катаракты.

Впервые подтверждено различие содержания белка слезы у пациентов с осложненной катарактой в зависимости от клинической картины полной или неполной осложненной катаракты :неполная – высокая острота зрения, консервативная терапия- 7,85-, полная осложненная катаракта – интенсивные помутнения хрусталика-7,96, требующие хирургического лечения-7,94 . Таким образом, нами документирована следующая закономерность, чем плотнее ядро хрусталика при **осложненной катаракте**, тем выше концентрация белка, в то время как при возрастной катаракте мы диагностировали постоянство белкового состава слезы вне зависимости от зрелости ядра хрусталика.

Расшифровывая наиболее низкие показатели содержания пероксида водорода в слезе пациентов второй группы(в 2,4 раза ниже, чем в группе контроля), было выявлено, что примерно 70% исследованных проб продемонстрировали отсутствие маркера антиоксидантной защиты органа зрения, что связано с развитием локального метаболического синдрома в ответ на фоновую патологию.

Список литературы

1. Архипова Л.Т Клинико-иммунологические факторы прогнозирования экссудативной реакции после экстракции сенильной катаракты с имплантацией эластичных интраокулярных линз / Архипова Л.Т., О.Г. Леванова, А.Д. Чупров, Г.А. Зайцева //Вестник офтальмологии.- 1999.- № 2.- С. 25-27.
2. Керимов К.Т. Анализ результатов экстракций катаракты методом факоэмульсификации /К.Т. Керимов, Э.И. Бархударова, С.Р. Меджимова //Сборник научных статей МНТК «Микрохирургия глаза» «Современные технологии хирургии катаракты».- М., 2003. С. 149-154.
3. Константинова Н.А. Роль циркулирующих иммунных комплексов в развитии послеоперационных осложнений у больных при экстракции катаракты /Н.А.Константинова, В.Г.Лихванцева,

Э.В.Егорова и др. //Вестник офтальмологии.-1992.- Т. 108, №2.- С. 34-36.

4. Корабаева Г.Т. Эпидемиологические особенности заболеваемости катарактой в Казахстане / Корабаева Г.Т. [и др.] // Молодой ученый. — 2011. — Т.2, №5. — С. 191- 194.

5. Кричевская Г.И. Пат.2025733 Российская Федерация, МПК G01 N33/53. Способ прогнозирования воспалительных осложнений при экстракции катаракты / Кричевская Г.И. ; заявитель и патентообладатель Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им.Гельмгольца — № 4829849/14 ; заявл. 29. 05. 90 ; опубл. 30. 12. 94, Бюл. № 7 — 5с.

6. Леванова О.Г. Сравнительная частота интраоперационных осложнений после внутриглазной хирургии / О.Г.Леванова, А.Д.Чупров, А.А.Замыров // Материалы съезда офтальмологов Причерноморья. Одесса. 2004. С.54-55.

7. Моумени А.Э. Интраокулярные линзы, изменяющие показания к их имплантации в США /А.Э.Моумени //Вестник офтальмологии.- 1987.- №2.- С. 14-16.

8. Власова Т.И. Иммунологические методы прогноза в хирургии осложненных катаракт: Дис... канд. мед. наук /Т.И. Власова — М., 1995- 180 с.

9. Гончарова Н.А. Предупреждение послеоперационного стрессиндуцированного иммунодефицита у больных с экстракцией катаракты: Автореф. дис... канд. мед. наук /Н.А. Гончарова.- Одесса, 1994.- 20с.

10. Дис. канд. мед. наук. / Т.А. Новикова-Билак ; Московский научно- исследовательский институт глазных болезней им.Гельмгольца. Москва, 2003.- 149 с.

11. Долгушин И.И. Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях /И.И.Долгушин //Тез. докл. X науч. конф,- Челябинск, 1990 — С. 21.

12. Дружинин И.Б. Особенности местного воспалительного процесса после удаления осложненной катаракты у больных СД и его коррекция: Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. / И.Б. Дружинин. М., 2008. 79 с.

13. Лихванцева В.Г. Клинико-иммунологические факторы у больных катарактой при имплантации ИОЛ: Дис... канд. мед. наук /В.Г.Лихванцева.- М., 1992- 140 с.

14. Лихванцева В.Г. Альтернативный путь активации комплемента у больных после экстракции катаракты с имплантацией интраокулярной линзы /Лихванцева В.Г., Ю.К.Наполов, Э.В.Егорова и др. // Вестник офтальмологии.- 1993.- Т. 109.- №2.- С. 14-16.

15. Могилевский С.Ю. Прогнозирование и лечение воспалительных осложнений после антиглаукоматозных операций: Автореф. дис... канд. мед. наук /С.Ю.Могилевский.- Одесса, 1993.- С. 20.
16. Петруня А.М. Иммунные механизмы развития экссудативных реакций на ИОЛ и их коррекция у больных с возрастными катарактами /А.М.Петруня, Г.В.Пантелеев //Офтальмохирургия.- 1995.- №3.- С.53-57.
17. Пучков С. Г. Изучение химического и механического воздействия интраокулярных линз из ПММА на орган зрения: Дис... канд. мед. наук /С.Г.Пучков,- М., 1973.- 174 с.
18. Стукалов С.Е. Иммунологические аспекты патогенеза и лечения экссудативной реакции при имплантации интраокулярных линз / С.Е.Стукалов, Т.В.Судовская //Вестник офтальмологии.- 1993,- Т. 109, № 3.- С. 12-14.
19. Федяшев Г.А. Сравнительная частота воспалительных реакций глаза после факоэмульсификации с имплантацией ИОЛ с жесткой оптической частью через различные виды разрезов / Г.А. Федяшев, А.В. Васильев // Сов Ченцова О.Б. Факторы риска развития экссудативных реакций после имплантации ИОЛ / О.Б. Ченцова, Д.А.Ковалькова // Федоровские чтения : материалы 8 науч. -практич. конф. с международным участием. Москва, 2009. -С.300-301.
20. Ченцова О.Б. Факторы риска развития экссудативных реакций после имплантации ИОЛ / О.Б. Ченцова, Д.А.Ковалькова // Федоровские чтения : материалы 8 науч. -практич. конф. с международным участием. Москва, 2009. -С.300-301.

УДК 616.517.8

*Гайковая Л.Б.¹, Шеламова Д.А.¹, Ермаков А.И.^{1,3},
Гулордава М.Д.^{1,2}, Замятина К.Н.¹*

*ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И.Мечникова»¹ Минздрава России,
НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «СЗГМУ
им. И.И. Мечникова»² Минздрава России, Санкт-Петербург
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр
имени В. А. Алмазова»³
Минздрава России, Санкт-Петербург
Larisa.Gaikovaya@szgmu.ru*

Показатели нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у пациентов с псориазом на стандартной терапии

С целью изучения нарушений сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у пациентов с псориазом в исследование было включено 20 пациентов.

В крови у пациентов до и после терапии определяли количество тромбоцитов и циркулирующих эндотелиальных клеток, а также степень агрегации тромбоцитов при индукции АДФ в разных концентрациях. Установлено, что у пациентов с псориазом количество эндотелиоцитов выше, чем в контрольной группе. Эффективность терапии следует оценивать по снижению количества эндотелиоцитов в крови и функциональной активности тромбоцитов.

Ключевые слова: псориаз, агрегация тромбоцитов, эндотелиоциты.

**Gajkovaya L.B.¹, Shelamova D.A.¹, Ermakov A.I.^{1,3},
Gulordava M.D.^{1,2}, Zamyatina K.N.¹**

Indicators of disorder of vascular plate hemostasis in patients with medium psoriasis on standard therapy

In order to study disorders of vascular-platelet hemostasis in patients with psoriasis, the study included 20 patients. In the blood of patients before and after therapy, the number of platelets and circulating endothelial cells was determined, as well as the degree of platelet aggregation upon induction of ADP at different concentrations. It was found that in patients with psoriasis, the number of endothelial cells is higher than in the control group. The effectiveness of therapy should be assessed by reducing the number of endothelial cells in the blood and the functional activity of platelets.

Key words: psoriasis, platelet aggregation, endothelial cells.

Введение. Псориаз – хроническое заболевание кожи мультифакториальной природы с доминирующим значением генетических факторов в его развитии, характеризующееся гиперпролиферацией эпидермальных клеток, нарушением кератинизации и воспалительной реакцией в дерме [2]. Согласно данным ВОЗ, распространенность псориаза в мире составляет около 2-4% от общей популяции. А частота встречаемости псориаза зависит от возраста и географического расположения [6, 9, 10, 11]. В последние годы отмечается увеличение числа тяжелых, атипичных, резистентных к проводимой терапии форм заболевания. Наличие у пациента псориаза значительно ухудшает качество его жизни, снижает социальную активность, работоспособность и может приводить к инвалидизации [2, 3, 8].

Несмотря на большое количество проведенных исследований, посвященных изучению этиологии и патогенеза псориаза, до сих пор не разработана единая концепция его возникновения. Безусловно, остается актуальным Th₁-зависимое аутоиммунное воспаление [4], которое приводит к усилению агрегационных свойств тромбоци-

тов – экспонированию на их поверхности Р-селектина, экскреции тромбоспандина-А2 и других процессов, что ухудшает процессы микроциркуляции и усиливает развитие эндотелиальной дисфункции [1, 5].

Исследования на группе пациентов с псориатическими поражениями показали, что нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза усиливают риск тромбоза, кардиоваскулярной патологии и их осложнений, особенно у лиц, плохо отвечающих на лечение псориаза и, поэтому, нуждающихся в пролонгации его лечения в стационарных условиях и дальнейшем мониторинге системы гемостаза [7].

Таким образом, выявление механизмов формирования гемостазиологических нарушений при псориазе определяет необходимость расширенного лабораторного обследования сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у данной группы пациентов и проведения дополнительной профилактики осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы.

Цель исследования. Изучить особенности эндотелиальной дисфункции и функциональной активности тромбоцитов у пациентов с псориазом до и после лечения.

Материалы и методы. В исследование были включены 20 пациентов с вульгарным и экссудативным псориазом в прогрессирующей и стационарной стадии (13 женщин и 7 мужчин) течением средней тяжести (среднее значение индекса тяжести поражения (PASI – 17)), находящихся на стационарном лечении в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Все пациенты получали стандартные схемы лечения: гипосенсибилизирующую, детоксикационную и селективную фототерапию. Средний возраст пациентов составил 48 ± 15 лет. Контрольная группа включала 25 добровольцев без заболеваний кожи, и была сопоставима по полу и возрасту с группой пациентов. Все обследованные дали информированное согласие на участие в исследовании. Забор венозной крови у пациентов осуществлялся дважды: в день поступления в дерматологическую клинику и перед выпиской, с соблюдением правил преаналитического этапа в вакуумные пробирки с цитратом натрия и K_2 ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Клинический анализ крови проводился на гематологическом анализаторе DxH 800 (Beckman Coulter, США). Анализ агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, выполнялся стандартным фотометрическим методом на оптическом агрегометре AP 2110 SOLAR (НПФ “SOLAR”, Белоруссия). Исследование циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) проводили на проточном цитометре FC 500 («Beckman Coulter», США) с использованием флуоресцент-

но-меченых моноклональных антител CD45-PC5 и CD146-PE. Все полученные результаты у пациентов до начала терапии в стационаре сравнивали с контрольной группой, а затем проводили сравнение лабораторных показателей только у пациентов в динамике – до и после терапии (на момент выписки из стационара).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программного пакета Statistica 10 for Windows (StatSoft, Inc., США). Числовые значения представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентиля (Me [C25–C75]). Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Для сравнения двух независимых переменных использовали тест Манна-Уитни. Для сравнения относительных показателей, характеризующих связанные совокупности (до и после лечения), нами использовался тест Мак-Немара. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При сравнительном анализе лабораторных показателей было выявлено статистически значимое повышение ($9,5/3 \times 10^5$ WBC [8,0-11,5]) уровня циркулирующих эндотелиальных клеток у пациентов с псориазом (до лечения) по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе – $3,0/3 \times 10^5$ WBC [1,0-5,0], $p < 0,001$. При рассмотрении других показателей сосудисто-тромбоцитарного гемостаза в их результатах не было выявлено значимых различий между группами пациентов и контроля (табл. 1).

Таблица 1. Лабораторные показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза в контрольной группе и в группе пациентов псориазом (до лечения)

Лабораторный показатель	Группа контроля, Me (C25–C75)	Группа пациентов (до лечения), Me (C25–C75)	p
Клинический анализ крови (тромбоцитарные показатели)			
Количество тромбоцитов, $\times 10^9$ /литр	245 (203-275)	246 (216-288)	0,714
Средний объем тромбоцитов, фл	9,2 (8,6-10,0)	9,1 (8,4-10,1)	0,672
Функциональная активность тромбоцитов			
Степень агрегации тромбоцитов с АДФ в концентрации 2 мкмоль/л, %	52,4 (36,9-63,5)	42,2 (26,0-56,9)	0,201
Степень агрегации тромбоцитов с АДФ в концентрации 4 мкмоль/л, %	74,1 (64,5-80,9)	62,0 (46,0-77,3)	0,071

Лабораторный показатель	Группа контроля, Ме (С25–С75)	Группа пациентов (до лечения), Ме (С25–С75)	p
Степень агрегации тромбоцитов с АДФ в концентрации 20 мкмоль/л, %	83,9 (71,5-92,8)	82,5 (76,7-89,6)	0,951
Показатели эндотелиальной дисфункции			
Количество циркулирующих эндотелиальных клеток, /3x10 ⁵ WBC	3,0 (1,0-5,0)	9,5 (8,0-11,5)	< 0,001

Динамическое наблюдение за данными показателями у пациентов с псориазом на фоне проводимой терапии выявило статистически значимое снижение только содержания циркулирующих эндотелиальных клеток – 9,5/3x10⁵ WBC [8,0-11,5] vs 6,0/3x10⁵ WBC [3,0-11,0], p<0,05; до и после лечения соответственно (рисунок 1). Однако данное снижение не пересекло 75-й перцентиль группы контроля, что, скорее всего, указывает на остаточную дисфункцию эндотелия. Анализ других лабораторных параметров выполненных после лечения данных пациентов не выявил статистически значимых различий в их значениях.

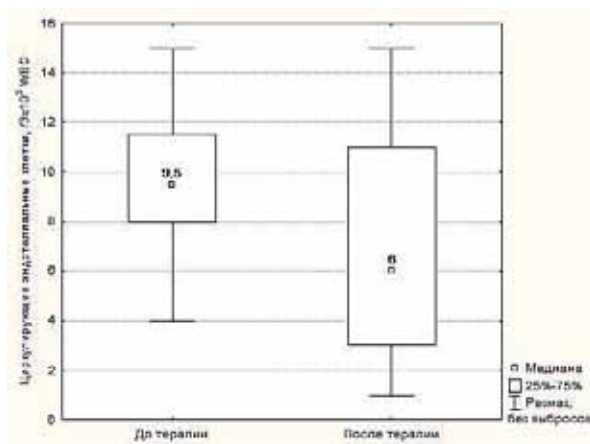


Рис. 1. Показатель уровня циркулирующих эндотелиальных клеток у пациентов с псориазом до и после терапии

Особый интерес представляет сравнение функциональной активности тромбоцитов между контрольной группой и пациентами с псориазом на момент выписки (после лечения) (табл. 2).

Таблица 2. Лабораторные показатели функциональной активности тромбоцитов в контрольной группе и в группе пациентов с псориазом после терапии

Лабораторный показатель	Группа контроля, Ме (С25–С75)	Группа пациентов (до лечения), Ме (С25–С75)	Группа пациентов (после лечения), Ме (С25–С75)
Степень агрегации тромбоцитов с АДФ в концентрации 2 мкмоль/л, %	52,4 (36,9-63,5)	42,2 (26,0-56,9)	31,9* (13,3-51,2)
Степень агрегации тромбоцитов с АДФ в концентрации 4 мкмоль/л, %	74,1 (64,5-80,9)	62,0 (46,0-77,3)	60,3* (32,2-68,8)
Степень агрегации тромбоцитов с АДФ в концентрации 20 мкмоль/л, %	83,9 (71,5-92,8)	82,5 (76,7-89,6)	82,4 (70,4-90,6)

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля

Как видно из таблицы 2, в тестах оптической агрегатометрии, при использовании в качестве индуктора активации тромбоцитов более низкие концентрации АДФ (2 и 4 мкмоль/л), имеются лабораторные признаки снижения функциональной активности тромбоцитов, которая, по-видимому, также отражает эффективность проводимой терапии. При применении АДФ в концентрации 20 мкмоль/л функциональная активность тромбоцитов по степени агрегации имела практически одинаковые значения во всех группах, что обусловлено закономерной гиперактивацией тромбоцитов в ответ на высокие дозы АДФ. При сравнении данных показателей у пациентов до и после лечения псориаза, исследуемые параметры функциональной активности тромбоцитов имели тенденцию к снижению на фоне терапии, однако значимо не различались.

Таким образом, выявленная особенность тромбоцитарного гемостаза у пациентов с псориазом средней степени тяжести на фоне стандартной терапии показывает относительное снижение функциональной активности тромбоцитов, что может являться еще одним дополнительным фактором, защищающим данных пациентов от развития тромботических осложнений на фоне основного заболевания.

Заключение. Выявленная особенность нарушений со стороны сосудисто-тромбоцитарного гемостаза при псориазе – повышенное содержание циркулирующих эндотелиальных клеток, может рассматриваться, как дополнительный лабораторный маркер обследования системы гемостаза у пациентов с псориазом, а также как дополнительный фактор риска развития тромботических осложнений в отсутствии патогенетической терапии данного заболевания.

Эффективность использования стандартных схем терапии при псориазе можно оценивать по снижению количества циркулирующих эндотелиальных клеток в крови и снижению степени агрегации тромбоцитов при малых дозах индуктора АДФ.

Список литературы

1. Баркаган З.С., Костюченко Г.И., Котовщикова Е.Ф. Гипергомоцистеинемия как самостоятельный фактор риска поражения и тромбирования кровеносных сосудов // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2002. № 1. С. 65-71.
2. Кубанова, А.А. Клинические рекомендации. Дерматовенерология. Четвертое, переработанное и дополненное издание А.А. Кубанова // Издательство: М.: ДЭКС-Пресс.- 2010.-428 с.
3. Кунгуров, Н. В. Псориатическая болезнь / Н.В. Кунгуров, Н.Н. Филимонкова, И.А. Тузанкина: Екатеринбург.- 2002.- 193 с.
4. Baker B.S. Recent advances in psoriasis: the role of the immune system / B.S. Baker. Imperial College Press, 2000.
5. Blackburn G.F., Shah H.P., Kenten J.H. et al. Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assay for clinical diagnostics // Clin. Chem. 1991. № 37. P. 1534-1539.
6. Chang, Yun-Ting. Epidemiological Study of Psoriasis in the National Health Insurance Database in Taiwan / Chang, Yun-Ting, Tzeng-Ji Chen, Pei-Chi Liu, Yu-Chun Chen, Yi-Ju Chen, Yu-Lin Huang, Jaw-Shyang Jih, Chih-Chiang Chen, Ding-Dar Lee, Wen-Jen Wang, Ming-Wei Lin, Han-Nan Liu // Acta Derm Venereol.- 2009.- №89.- С. 262-266.
7. Inflammation and Hypercoagulable State in Adult Psoriatic Men / O. Karabudak [et al.] // Acta Derm. Venereol. 2008. Vol. 88. P. 337-340.
8. Kimball, A.B. The psychosocial burden of psoriasis / A. B. Kimball, C. Jacobson, S. Weiss [et al.] // Amer. J. Clin.Dermatol.- 2005.- Vol. 6, № 6.- P.- 383-392.

9. Parisi, R. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence / R. Parisi, DP. Symmons, CE. Griffiths, et al. // J Invest Dermatol.- 2013.- №133.- С. 377.

10. Rahman, P. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic / P. Rahman and JT. Elder // Ann Rheum Dis.- 2005.-№64.- P. 37-39.

11. Sinnia, B Epidemiology of Psoriasis in Malaysia: A Hospital Based Study / B. Sinniah, Path S Saraswathy Devi, Dip Derm B S Prashant // Med J Malaysia.-2010- Vol 6.- С 112-114.

УДК 616.69-008.6+611.013.12]-07:[616.69-008.8:577.112:577.175.446]-078.3

Галькович К.Р., Соснин Д.Ю., Кривцов А.В.
ФГБОУ ВО «ПГМУ им академика Е. А. Вагнера» Минздрава России
Пермь
sosnin_dm@mail.ru

Концентрация моноцитарного хемотаксического протеина и прокальцитонина в эякуляте у здоровых мужчин и у пациентов с нарушением сперматогенеза

Установлена взаимосвязь между повышенным содержанием прокальцитонина (PCT) в семенной плазме и снижением фертильности спермы. Концентрация моноцитарного хемотаксического протеина (MCP-1) в эякуляте достоверно не различалась у здоровых мужчин и у больных олигозооастеноспермией.

Ключевые слова: моноцитарный хемотаксический протеин, MCP-1, прокальцитонин, PCT, семенная плазма; эякулят, мужское бесплодие.

Gal'kovich K.R., Sosnin D.Yu., Krivtsov A.V.
E.A.Vagner Perm State Medical University
Perm

Concentration of monocyte chemotactic protein and procalcitonin in ejaculate in healthy men and in patients with impaired spermatogenesis

A relationship was established between the increased content of Procalcitonin in seminal plasma and a decrease in sperm fertility. The concentration of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in the ejaculate did not differ significantly in healthy men and in patients with oligozoostenospermia.

Key words: monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1, procalcitonin, PCT, seminal plasma; ejaculate, male infertility.

При исследовании протеома семенной плазмы, обнаружена взаимосвязь её компонентов с показателями концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов [5]. Возрастает интерес к исследованию белков в сперме, изменение уровня содержания которых может указывать на снижение фертильности эякулята и возможное развитие бесплодия у мужчины.

Цель исследования. Изучить динамику концентрации моноцитарного хемотаксического протеина (MCP-1) и прокальцитонина (ПКТ, *англ.* PCT) в эякуляте здоровых мужчин и больных олигозооспермией.

Материалы и методы. Обследованы мужчины (n=48) репродуктивного возраста, обратившиеся в медицинские учреждения г. Перми по поводу диагностики и лечения бесплодного брака, которым в соответствии с алгоритмом обследования был сделан рутинный анализ спермы [2]. Эякулят мужчин, включенных в настоящее исследование, характеризовался нормальными параметрами концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов. Критериями исключения являлась повышенная вязкость эякулята (более 20 мм по тесту отрыва нити) [2].

Анализ эякулята выполняли в соответствии с рекомендациям Всемирной организации здравоохранения с использованием анализатора эякулята спермы SQA-V («MES», Израиль) [1,2]. Семенную плазму отделяли путем центрифугирования на центрифуге при 3000 об/минуту в течение 15-20 минут. Аликвоты биологического материала переносили в пробирки типа Эппендорф и хранили до исследования при температуре -40° С.

По результатам исследования эякулята все обследованные были разделены на две группы. Основную группу (группа 1) составили 24 пациента с олигозооспермией (концентрация сперматозоидов ниже 15 млн/мл). Группа сравнения (группа 2) была представлена образцами эякулята 24 здоровых мужчин, характеризовавшихся нормальными параметрами [2]. Группы были сопоставимы по возрасту.

Концентрацию MCP-1 и PCT определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реактивов «MCP-1 – ИФА – БЕСТ» и «Прокальцитонин – ИФА – БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Оптическую плотность проб измеряли на планшетном иммуноферментном анализаторе Stat Fax 4300® (Chromate) (Awarenes, USA).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA v. 7 (StatSoftInc., США).

Для сравнения двух независимых выборок применяли U -критерий Манна – Уитни. За максимально приемлемую вероятность ошибки первого рода (p) принимали величину уровня статистической значимости равную или меньшую $0,05$.

Результаты и их обсуждение

МСР-1 и РСТ и были выявлены во всех образцах семенной плазмы здоровых мужчин и больных олигозооастеноспермией (табл. 1).

Таблица 1. Содержание прокальцитонина (РСТ) и моноцитарного хемотаксического протеина (МСР-1) в семенной плазме обследованных

Концентрация белка	Основная группа (n=24)	Группа сравнения (n=24)	p* (U-критерий Mann-Whitney)
Прокальцитонин, нг/мл	0,316 (0,181–0,745)	0,223 (0,065–0,276)	0,011* (U=638,0)
Моноцитарный хемотаксический протеин, пг/мл	2126,6 (1270,2–2780,1)	2232,6 (1813,4–2825,8)	0,516 (U=256,0)

Примечание: в таблице представлены медиана и интерквартильный диапазон (Ме и 25% квартиль; 75% квартиль)

* – различие между группами.

Установлены статистически значимые различия в концентрации РСТ в семенной плазме между основной группой и группой сравнения ($p=0,0095$). Показатели содержания другого компонента семенной плазмы – МСР-1 достоверно не различались между исследуемыми группами мужчин ($p=0,516$).

МСР-1 присутствует в эякуляте здоровых мужчин и в эякуляте мужчин со сниженной фертильностью [4]. У больных с низкими показателями концентрации и количества сперматозоидов наблюдается лишь тенденция к уменьшению уровня МСР-1 в сперме в сравнении со здоровыми, но достоверных различий в группах не отмечается. Содержание МСР-1 и РСТ не коррелирует с концентрацией сперматозоидов ($p>0,05$) и количеством сперматозоидов в эякуляте ($p>0,05$), но в образцах спермы со сниженным содержанием сперматозоидов

уровень РСТ статистически значимо выше в сравнении с содержанием данного белка в образцах фертильного эякулята (табл. 1). Полученные данные позволяют предположить, что повышенный уровень РСТ в семенной плазме является неблагоприятным фактором, связанным с уменьшенной фертильностью спермы [3]. Это обуславливает необходимость проведения исследований для уточнения диагностического значения указанного протеина в составе эякулята.

По нашему мнению, МСР-1 семенной плазмы не может выступать в роли маркера для раннего выявления мужской инфертильности, так как отсутствуют достоверные различия его концентрации в образцах спермы с нормальными показателями и в образцах с олигозооспермией. Уровень РСТ в образцах эякулята со сниженным содержанием сперматозоидов статистически значимо выше его уровня в образцах фертильного эякулята, что возможно указывает на маркёрную роль данного протеина в определении инфертильности мужчин.

Список литературы

1. Кубарев О.Г., Ненашева О.Ю., Галькович К.Р. Использование автоматического анализатора для исследования эякулята // Лабораторная служба. 2018. Т. 7, №3. С. 183.
2. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека // Пер. с англ. Н.П. Макарова. Науч. ред. Л.Ф. Курило. 5-е изд. М.: Капитал Принт, 2012. 291 с.
3. Соснин Д.Ю., Зубарева Н.А., Ненашева О.Ю., Кривцов, А.В., Каримова, Н.В., Поздин Н.В. Концентрация прокальцитонина в эякуляте и сыворотке крови здоровых мужчин и мужчин с олигозооспермией // Урология. 2017. №1. С. 61-65. doi: 10.18565/urol.2017.1.61-65
4. Соснин Д.Ю., Галькович К.Р. Содержание моноцитарного хемотаксического фактора в нормальной сперме и в образцах эякулята с пониженной фертильностью // Пермский медицинский журнал. 2019. Т. 36, №3 — С. 29–37. doi: 10.17816/pmj36328-37
5. Leahy T, Rickard JP, Pini T, Gadella BM, de Graaf SP. Quantitative Proteomic Analysis of Seminal Plasma, Sperm Membrane Proteins, and Seminal Extracellular Vesicles Suggests Vesicular Mechanisms Aid in the Removal and Addition of Proteins to the Ram Sperm // Proteomics. 2020. V.20, №12 — e1900289. doi: 10.1002/pmic.201900289

УДК 616-079.4

*Гоманова Л.И., Сытая Ю.С., Канишина Н.Н.
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России
Москва*

*gomanova_liliya@mail.ru, julia.98.med.university@mail.ru,
kanshinann@mail.ru*

Омиксные технологии как современный этап персонализированной лабораторной диагностики сепсиса

Последние достижения в области клинично-лабораторных исследований, в частности генетического и биохимического анализа, позволяют проводить исследования больших групп пациентов с помощью технологий “Omics”. Эти новые возможности могут привести к изменению парадигмы подхода к сепсису в сторону персонализированного лечения и профилактики заболевания.

***Ключевые слова:** сепсис, диагностика, омиксные технологии, геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика.*

*Gomanova L.I., Sytaya J.S., Kanshina N.N.
First Moscow I.M. Sechenov State Medical University
Moscow*

Omics technologies as a new stage of sepsis precision laboratory diagnostics

Recent advances in the field of clinical and laboratory research, in particular genetic and biochemical analysis, allow conduct studies among large groups of patients using Omics technologies. These new opportunities may lead to a paradigm shift in the approach to sepsis towards personalized treatment and disease prevention.

***Keywords:** sepsis, diagnostics, omics technologies, genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics.*

Введение. На сегодняшний день методы диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний продолжают развиваться. За последние десятилетия неоценимым оказался вклад совершенствования клинично-лабораторных принципов исследования болезней. Своевременная диагностика является ключом к успеху улучшения качества жизни пациента, однако не менее важную роль играет профилактика. «Болезнь легче предупредить, чем лечить», – эти бессмертные слова принадлежат великому «отцу медицины» Гиппократу. Профилакти-

ка заболевания заключается не только в снижении влияния факторов риска или проведении иммунизации среди населения, но и в изучении предрасположенности конкретного человека к конкретной болезни. Эта концепция легла в основу развития персонализированной медицины. Целью персонализированной медицины является поиск, развитие и использование современных методов молекулярной диагностики для повышения эффективности лечения и выявления предрасположенности пациента к тем или иным заболеваниям [1].

Среди основных направлений омиксных технологий выделяют: геномику, транскриптомику, протеомику и метаболомику. Данные современные методы позволяют решить вопрос ранней диагностики инфекционных заболеваний, прогнозировать течение болезни и оценить эффективность проводимых лечебных мероприятий. Данная сфера клинико-лабораторной диагностики продолжает активно развиваться. Использование омиксных технологий для обнаружения новых биомаркеров, связанных с инфекцией, в сочетании с новыми алгоритмами лечения открывает возможность для незамедлительной дифференцировки различных заболеваний [4].

В данной статье, основанной на изучении зарубежной и отечественной литературы последних лет из баз PubMed и eLibrary, будут представлены современные тенденции развития омиксных технологий на примере лабораторной диагностики сепсиса.

Сепсис и омиксные технологии. В соответствии с определением ВОЗ (2017), «Сепсис – это опасная для жизни дисфункция внутренних органов, вызванная нарушением регуляции ответа организма на инфекцию». Мировое эпидемиологическое бремя сепсиса не поддается точной оценке. Согласно данным ВОЗ, ежегодно сепсис развивается более чем у 30 млн человек по всему миру, а у 6 млн человек он приводит к летальному исходу [10]. По результатам национального исследования 1990–2017 гг. Kristina E. Rudd и соавт. в 2017 году мировая инцидентность сепсиса составила 48,9 млн человек (677,5 на 100 000 населения) [11]. Диагностика и профилактика сепсиса в развитых и развивающихся странах остается одной из наиболее актуальных вопросов медицины, поскольку рост антибиотико-резистентных штаммов бактерий, увеличение доли фунгальных агентов, несвоевременно начатая антибактериальная терапия и неблагоприятный коморбидный фон пациента приводят к тому, что среди пациентов с сепсисом почти у каждого второго развивается полиорганная недостаточность.

Среди наиболее распространенных биомаркеров сепсиса принято выделять прокальцитонин, С-реактивный белок, лактат, ИЛ-6, ИЛ-8, отношение числа нейтрофилов к лимфоцитам, CD 64 [7]. К сожалению, каждый из перечисленных биомаркеров не обладает достаточ-

ной специфичностью и чувствительностью. Одним из наиболее часто применяемых на практике биомаркеров является прокальцитонин. Christina Wacker и соавт. в мета-анализе продемонстрировали, что чувствительность прокальцитонинового теста составила 0.77 (95% ДИ 0.72-0.81), специфичность – 0.79 (95% ДИ 0.74-0.84), а площадь под ROC-кривой составила 0.85 (95% ДИ 0.81-0.88). Авторы отметили, что прокальцитонин является самым лучшим маркером из тех, что существуют сегодня. Однако как самостоятельный вид теста он не рекомендуется для диагностики сепсиса [13]. Перспективным методом в клинико-лабораторной диагностики сепсиса является определение концентрации пресепсина. Мета-анализ Jiayuan Wu и соавт. показал, что чувствительность пресепсина составила 0.78 (95% ДИ 0.76-0.80), специфичность – 0.83 (95% ДИ 0.80-0.85), а площадь под ROC-кривой была 0.89 (95% ДИ 0.84-0.94) [15]. В исследовании Chin-Chieh Wu и соавт. отметили, что среди пациентов в ОРИТ чувствительность пресепсина оказалась выше, чем прокальцитонина (0.88, 95% ДИ 0.82-0.92 и 0.75, 95% ДИ 0.68-0.81, соответственно), однако его специфичность была ниже, чем для прокальцитонина (0.58, 95% ДИ 0.42-0.73 и 0.75, 95% ДИ 0.65-0.83, соответственно) [14]. Однако данные биомаркеры не способны отражать индивидуальные изменения пациентов с сепсисом, поскольку данная популяция неоднородная и требует персонализированного подхода.

Главным скачком от традиционного биохимического анализа к омиксным технологиям является способность количественно оценивать состояние человека в отношении генов, РНК, белков, метаболитов, в то время как предыдущие подходы были более или менее ограничены одной или несколькими молекулами. Геномика применяется для оценки наследственного генетического материала или мутаций ДНК в соматических клетках. Эпигеномика занимается систематическим измерением всех эпигенетических изменений в геноме человека или гистоновых белках [5]. В соответствии с исследованием Jianhua Zhai и соавт. три ключевых пути (путь, ассоциированный с рибосомами, клеточный цикл и активация нейтрофилов) были тесно связаны с развитием сепсиса. Было показано, что гены TRIM25, RNF4 и MYC были ключевыми биомаркерами, связанными с прогрессированием сепсиса у пациентов [16].

Транскриптомика, или анализ экспрессии генов, позволяет оценить транскрибированную РНК человека в крови или клетках в данный момент времени. МикроРНК (miRNAs) представляют собой группу небольших (20-24 нуклеотидов) молекул РНК, которые не кодируют белки, но регулируют экспрессию генов. Подсчитано, что гены miRNA составляют только около 1% генома человека, но ре-

гулируют до 60% всех генов, кодирующих белки. МикроРНК являются перспективными биомаркерами, поскольку они чрезвычайно стабильны в условиях (перепады температуры, изменения pH), при которых большинство РНК разрушается. Fabian Benz и соавт. продемонстрировали, что miR-25, miR-133a, miR-146, miR-150 и miR-223 связаны с развитием сепсиса. Среди них наибольшую статистическую связь продемонстрировала miR-25 [2].

Для оценки состава белков в крови или клетках, который отражал бы значимые изменения при конкретном заболевании, применяется протеомика. Thanusi Thavarajah и соавт. провели исследование, направленное на выявление белков, отражающих специфичные колебания в крови и/или клетках при сепсисе. Детекция с помощью жидкостной хроматографии (Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric (LC/ESI-MS/MS) позволила выявить панели генов, кодирующих белки, ассоциированные с развитием сепсиса (ITIH3, SAA2, SAA1, FN1, COL24A1, POTEV, KANK1, SDCBP2, DNAH11, ADAMTS7, MLLT1, TTC21A, TSHR, SLX4, MTCH1, PUS7L). Авторы отметили, что расщепление белка SAA1 (Serum Amyloid A1 – сывороточный амилоид A1) для высвобождения пептидов с конца -COOH и других участков было более частым при сепсисе по сравнению со всеми другими заболеваниями и контрольной группой [12].

Метабомика является инновационным методом аналитического профилирования, который позволяет исследовать набор молекул низкой молекулярной массы, включая сахара, липиды, мелкие пептиды, витамины и аминокислоты, присутствующих в клетках, тканях, органах и биологических жидкостях. Eckerle и соавт. в результате исследования выявили, что среди взрослых, поступивших в ОРИТ после травматического повреждения, метаболические профили успешно дифференцировали тех, у кого развился сепсис, от тех, у кого его не было. Аналогичные различия наблюдались и у детей, у которых метаболические профили четко отличали сепсис от асептического воспаления. При раннем сепсисе, как у взрослых, так и у детей, метаболиты, участвующие в энергетическом обмене, демонстрировали последовательные направленные изменения. Кетоновые тела увеличивались, а уровни цитрата, соединений пентозофосфатного пути, рибитола и рибоновой кислоты снижались. Кроме того, несколько исследований выявили глюкозу, лактат, ацетат и цитрат в качестве метаболитов, которые дифференцируют сепсис и синдром системного воспалительного ответа. Метабомика выявила различия в энергетическом обмене между здоровыми пациентами и пациентами с сепсисом, а также между выжившими и не выжившими при сепсисе [3, 5].

Отдельную роль играет липидомика в диагностике сепсиса. Современные исследования доказывают, что изучение концентраций разнообразных фосфолипидов (лизофосфатидилхолин, глицерофосфатидилхолин др.) и ацилкарнитинов могут помочь разграничить сепсис от неинфекционных системных воспалительных процессов [9]. Giovana Colozza Mecatti и соавт. в исследовании показали, что среди септических пациентов наблюдались снижение уровней лизофосфатидилхолина и сфингомиелина, однако увеличение уровня фосфатидилхолина [8].

Заключение. С появлением и расширением геномных технологий появилась надежда, что понимание причин многих распространенных заболеваний будет объяснено изменениями в генетике хозяина. Однако к концу этого десятилетия стало ясно, что генетика позволяет выявить лишь часть факторов риска заболевания. Окружающая среда и другие факторы также играют определенную роль в стимулировании патогенных изменений. Поэтому для получения более ясной картины заболеваний, в частности сепсиса, необходимо проанализировать всю систему с помощью различных методов Omics, что позволит выявить либо наследственные факторы риска, либо изменения в биохимических процессах, которые приводят к развитию заболевания. Технологии Omics, с другой стороны, позволяют измерять от нескольких сотен аналитов (некоторые подходы метаболомики и протеомики) до миллиона аналитов (подходы геномики). Это позволяет критически оценивать не отдельные молекулярные ассоциации, а целые пути патогенеза заболевания. Интеграция перечисленных омиксных профилей позволяет применять подходы системной биологии для выявления новой патофизиологии заболевания. Применение вышеуказанных методов позволило выявить сотни новых биомаркеров, связанных с сепсисом. Накопление опыта использования омиксных технологий позволит в будущем идентифицировать и стратифицировать отдельные лица или группы пациентов на основе риска развития сепсиса.

Список литературы

1. Пальцев М.А., Чемезов А.С., Линькова Н.С., Дробинцева А.О., Полякова В.О., Белушкина Н.Н., Кветной И.М. Омиксные технологии: роль и значение для развития персонализированной медицины // Молекулярная медицина. 2019. N 4. С. 3-8.
2. Benz F., Roy S., Trautwein C., Roderburg C., Luedde T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis // Int J Mol Sci. 2016. N 1. С. 78.
3. Eckerle M., Ambroggio L., Puskarich M.A., Winston B., Jones A.E., Standiford T.J., Stringer K.A. Metabolomics as a Driver in Advancing Precision Medicine in Sepsis // Pharmacotherapy. 2017. N 9. С. 1023-1032.

4. Houten C.B., Oved K., Eden E, Cohen A., Engelhard D., Boers S., Kraaij R., Karlsson R., Fernandez D., Gonzalez E., Li Y., Stubbs A., Moore E.R.B., Hays J.P., Bont L.J. Observational multi-centre, prospective study to characterize novel pathogen-and host-related factors in hospitalized patients with lower respiratory tract infections and/or sepsis – the “TAILORED-Treatment” study // *BMC Infect Dis*. 2018. N 1. C. 377.
5. Itenov T.S., Murray D.D., Jensen J.U.S. Sepsis: Personalized Medicine Utilizing ‘Omic’ Technologies-A Paradigm Shift? // *Healthcare* (Basel). 2018. N 3. C. 111.
6. Langley R.J., Wong H.R. Early Diagnosis of Sepsis: Is an Integrated Omics Approach the Way Forward? // *Mol Diagn Ther*. 2017. N 5. C. 525-537.
7. Liu Y., Hou J.H., Li Q., Chen K.J., Wang S.N., Wang J.M. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis // *Springerplus*. 2016. N 1. C. 2091.
8. Mecatti G.C., Messias M.C.F., Sant’Anna Paiola R.M., Figueiredo Angolini C.F., da Silva Cunha I.B., Eberlin M.N., de Oliveira Carvalho P. Lipidomic Profiling of Plasma and Erythrocytes From Septic Patients Reveals Potential Biomarker Candidates // *Biomark Insights*. 2018. N 13.
9. Mecatti G.C., Messias M.C.F., de Oliveira Carvalho P. Lipidomic profile and candidate biomarkers in septic patients // *Lipids Health Dis*. 2020. N 1. C. 68.
10. Reinhart K., Daniels R., Kissoon N., Machado F.R., Schachter R.D., Finfer S.N. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority – A WHO Resolution // *Engl J Med*. 2017. N 5. C. 414-417.
11. Rudd K.E., Johnson S.C., Agesa K.M., Shackelford K.A., Tsoi D., Kievlan D.R., Colombara D.V., Ikuta K.S., Kissoon N., Finfer S., Fleischmann-Struzek C., Machado F.R., Reinhart K.K., Rowan K., Seymour C.W., Watson R.S., West T.E., Marinho F., Hay S.I., Lozano R., Lopez A.D., Angus D.C., Murray C.J.L., Naghavi M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study // *Lancet*. 2020. N 10219. C. 200-211.
12. Thavarajah T., Dos Santos C.C., Slutsky A.S., Marshall J.C., Bowden P., Romaschin A. Marshall J.G. The plasma peptides of sepsis // *Clin Proteomics*. 2020. N 17. C. 26.
13. Wacker C., Prkno A., Brunkhorst F.M., Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis // *Lancet Infect Dis*. 2013. N 5. C. 426-435.
14. Wu C.C., Lan H.M., Han S.T., Chaou C.H., Yeh C.F., Liu S.H., Li C.H., Blaney G.N., Liu Z.Y., Chen K.F. Comparison of diagnostic

accuracy in sepsis between presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis // Ann Intensive Care. 2017. N 1. С. 91.

15. Wu J., Hu L., Zhang G., Wu F., He T. Accuracy of Presepsin in Sepsis Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis // PLoS One. 2015. N 7.

16. Zhai J., Qi A., Zhang Y., Jiao L., Liu Y., Shou S. Bioinformatics Analysis for Multiple Gene Expression Profiles in Sepsis // Med Sci Monit. 2020. N 26.

УДК 577.29

Горбенко Д.А.^{1,2}, Шкоденко Л.А.¹, Мальцева Ю.И.¹, Рубель М.С.¹,

Штро А.А.³, Зарубаев В.В.⁴, Слита А.В.⁴, Колпашчиков Д.М.^{1,5}

Университет ИТМО¹, ФТИ им. Иоффе²,

НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева³, Санкт-Петербургский НИИ

эпидемиологии и микробиологии имени Пастера⁴,

Химический факультет, Университет

Центральной Флориды в Орландо⁵

Санкт-Петербург

daryarogova7@gmail.com

Пероксидазоподобные дезоксирибозимы для детекции бактериальных и вирусных патогенов

Приведена детекция РНК- NASBA ампликонов E.coli и Streptococcus pneumoniae, а также герпес-вируса 1 с использованием двух сенсорных систем на основе дезоксирибозимов. Чувствительность системы составила 10 бактериальных или 10 инфицированных инфицированных клеток. Исследование закладывает основу для диагностики инфекционных заболеваний «на месте».

Ключевые слова: обнаружение патогенов, колориметрический анализ, Escherichia coli, Streptococcus pneumoniae, HSV1, NASBA, дезоксирибозим

Gorbenko D.A.^{1,2}, Shkodenko L.A.¹, Maltseva Yu.I.¹, Rubel M.S.¹,

Shtro A.A.³, Zarubaev V.V.⁴, Slita A.V.⁴, Kolpashchikov D.M.^{1,5}

ITMO University¹, Ioffe Institute², Smorodintsev research Institute of

Influenza³, Pasteur Institute of Epidemiology

and Microbiology, Department of Chemistry⁴, University of Central

Florida at Orlando⁵

St. Petersburg

Peroxidase-like deoxyribozymes for the bacterial and viral pathogens detection

In this study, the NASBA RNA amplicons of E. coli and Streptococcus pneumoniae, as well as the herpes virus, HSV1, were detected using two sensor systems based on deoxyribozymes. The sensitivity of the system was as low as 10

bacterial or 10 virus infected cells. The study lays a foundation for point-of-care diagnostics of infectious diseases.

Key words: *pathogen detection, colorimetric assay, E.coli, Streptococcus pneumoniae, HSV1, NASBA, deoxyribozime.*

В настоящее время существует острая потребность в быстрых, высокоселективных и недорогих диагностических системах, не требующих специализированных диагностических центров. Это особенно очевидно в условиях нынешней пандемии коронавируса, которая может быть разрешена путем скрининга всего населения с помощью быстрых и доступных тестов с последующей изоляцией всех инфицированных. В настоящее время разработаны и используются различные типы биосенсоров: от акустических и электрохимических до оптоэлектрических и колориметрических [1-4].

Большие перспективы заключаются в разработке колориметрических биосенсоров, указывающих на присутствие патогенов по оптическому изменению цвета. В этом исследовании мы разработали систему обнаружения патогенов *E. coli* и *S.pneumoniae*, а также вируса герпеса первого типа (HSV1) в качестве модельных патогенов. Предлагаемая система основана на изотермической амплификации на основе нуклеиновых кислот (NASBA) РНК-патогена, что позволяет избежать необходимости использования дорогостоящих термоциклов. *E. coli* — один из наиболее изученных видов грамотрицательных палочковидных бактерий, широко распространенных среди животных. Серотип *E. coli* O157: H7 может вызвать тяжелое пищевое отравление [5]. *S. pneumoniae* — это бактерия, вызывающая ряд распространенных заболеваний, как серьезных, таких как менингит, сепсис и пневмония [6]. HSV1 — очень заразная инфекция, распространенная и эндемичная во всем мире, которая после первоначальной острой фазы создает скрытую инфекцию, вызывая при определенных условиях периодические рецидивы болезни [7].

Бактериальные и вирусные штаммы и условия культивирования. Для детекции бактерий мы выбрали определенные гены, которые конститутивно экспрессируются и уникальны для конкретного организма. Для вирусных агентов был выбран белок капсида.

S.pneumoniae (серотип 6ABCD) и *E.coli* K12 выращивали при стандартных условиях. Количество образцов определяли путем посева серийных 10-кратных разведений клеточных суспензий в 0,5% NaCl на 1,5% колумбийский агар после 1 дня инкубации.

Клеточную линию Vero (ECACC 84113001) использовали для культивирования вируса герпеса HSV1. Клетки инфицировали в суточных

культурах, когда толщина монослоя достигала 80%. РНК выделяли через 18ч культивирования до лизиса и выхода вирусных частиц.

РНК экстрагировали с помощью модифицированного фенол-хлороформного метода и реагента ExtractRNA, Evrogen, LLC.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, используемые в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера 5'-3'
Spneu16sp2	caatctattcagacttc
Spneu16sp1	aattctaatacactactataggg act ctc ccc tct tgc act
Ecoli16sp2	taaagtgtagactgaat
Ecoli16sp1	aattctaatacactactatagggatggcctcccacgttcgc
Hsv12ul22p2	cttgattggactgatg
Hsv12ul22p1	aattctaatacactactatagggcctttgagccggcacc
S.pneumoniae_f-1	ggg tt ggg /isp9/ tcg gca aac ctg ctt cat ct aacc
S.pneumoniae_m-1	ccta tca agc gtt t /isp9/ ggg ta ggg
E.coli_f-1	cccta gcg ctt tac gcc cag taa tt /isp9/ ggg ta ggg
E.coli_m-1	ggg tt ggg /isp9/ ccg att aac g aacc
Hsv_ul22_f-1	ggg ta ggg /isp9/ gctggtacgaggagcgtttt cccta
Hsv_ul22_m-1	c cat ctc tgcc ccttcttc /isp9/ ggg tt ggg
Ipdz	ggg tag gcc ggg ttg ggt tc rg ru cc atg agc aac tcg ccc
Pdz	ggg tag gcc ggg ttg ggt tcg
Dza_s.pneumoniae	ccc tgt atc aag cgt tt a caa cga gaacc aac c
Dzb_s.pneumoniae	gt tgc tca tgg a gg cta gct tcg gca aac ctg ctt cat ct
Dza_e.coli	gcg ctt tac gcc cag taa tt a caa cga gaacc aac c
Dzb_e.coli	gt tgc tca tgg a gg cta gct ccg att aac gct tgc acc ct
Dza_hsv_ul22	c atc tet gcc cct tet tcg c a caa cga gaacc aac c
Dzb_hsv_ul22	gt tgc tca tgg a gg cta gct tg gta cga gga gcg ctt ttg
S.pneumoniae_rna	acg caa tct agc aga tga agc agg ttt gcc gaa aac gct tga tac agg gag ttt agc tgg aat taa aac gca cga
E.coli_rna	tac gga ggg tgc aag cgt taa tcg gaa tta ctg ggc gta aag cgc acg cag gcg gtt tgt taa gtc aga tgt gaa at
Hsv_ul22_rna	gaa cta aac ctg act acg gca tct ctg ccc ctt ctt cgc tgg tac gag gag cgc ttt tgt ttt gta ttg gtc acc acg gcc gag ttt cc

NASBA. Краткое описание условий реакции NASBA: 40 мМ Трис-НCl, рН 8,5, 50 мМ KCl, 12 мМ MgCl₂, 2 мМ NTP (каждый), 1 мМ dNTP (каждый), 10 мМ DTT, 0,2 мМ Праймер 1, 0,2 мМ Праймер 2, 15% ДМСО, 100 мкг / мл БСА, 20 ед. РНК-полимеразы T7, 8 ед. Обратной транскриптазы MMLV, 0,2 ед. РНКазы H, 12,5 ед. ингибитора РНКаз, 1 мкл матрицы. Инкубацию проводили при 41 °С в течение 60-90 мин.

Предел чувствительности анализа определяли серийным разведением известных количеств бактериальных или вирусных клеток.

Детекция. В части обнаружения патогенов был использован гуаниновый квадруплекс (G-4), образующий дезоксирибозим (Dz) для визуального выявления бактериальных и вирусных патогенов. Этот зонд имеет различные применения, от обнаружения свернутых ампликонов ДНК / РНК до идентификации точечных мутаций при комнатной температуре, что приводит к визуальным результатам. Были использованы два варианта технологии: бинарный (G-4-образующий пероксидазный Dz) и каскадный пероксидазный Dz. Бинарный Dz состоит из двух цепей ДНК, которые образуют структуру G-4 при гибридизации с прилегающими позициями анализируемого вещества ДНК или РНК. G-4 связывает гемин и катализирует H₂O₂-зависимое окисление бесцветного субстрата до окрашенного продукта (рис. 1).

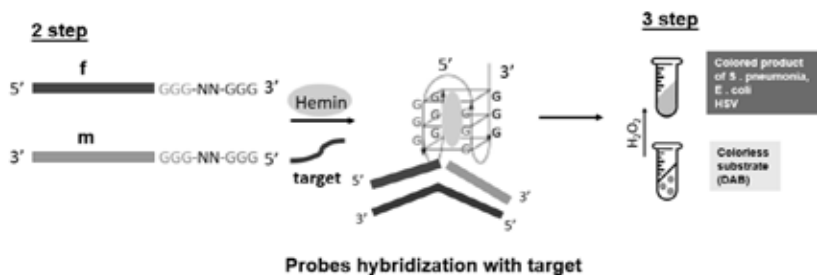


Рис. 1. Визуальное обнаружение бактериальных или вирусных патогенов с помощью расщепленного G-4: Этап 2 — цепи f и m гибридизируются с целевым анализом и образуют структуру G-4 [8]. Этап 3 — формирование цвета в присутствии гемина, H₂O₂ и диаминобензидина (DAB)

Детекция проводилась в реакционном буфере путем добавления нитей m и f по 1 мкМ каждая, DAB 1 мкМ, H₂O₂ 1%, 1 мкМ и гемин 200нМ. В качестве отрицательного контроля использовалась реакционная смесь NASBA, не содержащая РНК, в качестве положи-

тельного контроля — образец с 1 мкМ синтетического аналита. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут с последующим визуальным анализом и измерением оптической плотности ($\lambda = 500$ нм) с помощью спектрофотометра NP80, Implen, Германия. Наблюдали изменение цвета от бесцветного до коричневатого и увеличение оптической плотности в пять или более раз по сравнению с отрицательным контролем.

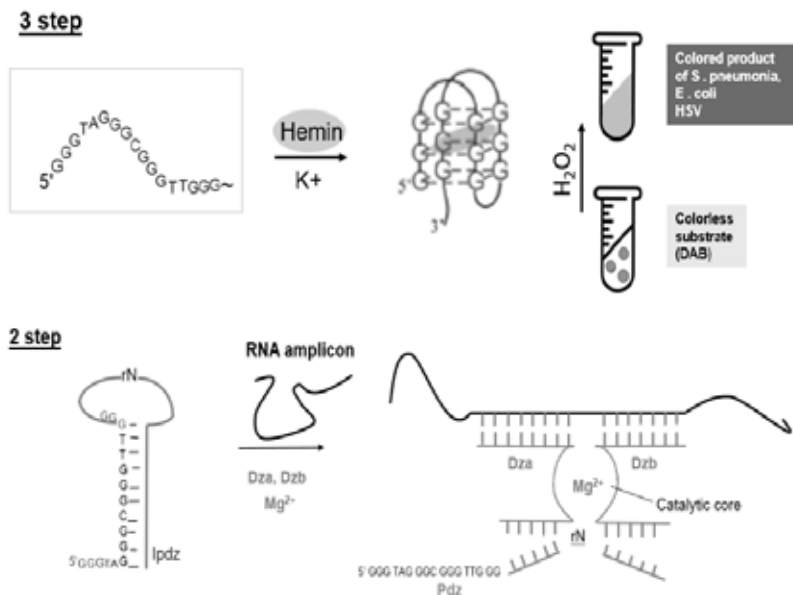


Рис. 2. Визуальное обнаружение бактериальных или вирусных патогенов с помощью каскадного РНК-расщепляющего и пероксидазоподобного Dz. Шаг 2 распознавание и активация IPDz в каскадном режиме [9]. Шаг 3 формирование структуры G-4 и генерация цвета в каскадном режиме.

В каскадном режиме РНК-аналиты распознаются РНК-расщепляющими Dz зондами с последующим расщеплением химерного субстрата ДНК / РНК, который выпускает в раствор пероксидазный G-4 (рис. 3).

IPDz 1мкМ, 1 мкм Dza и Dzb были смешаны или с синтетическим аналитом, либо с продуктом реакции NASBA в реакционном буфере и инкубировались при 50°C в течение 1 часа. Для бактериальной и

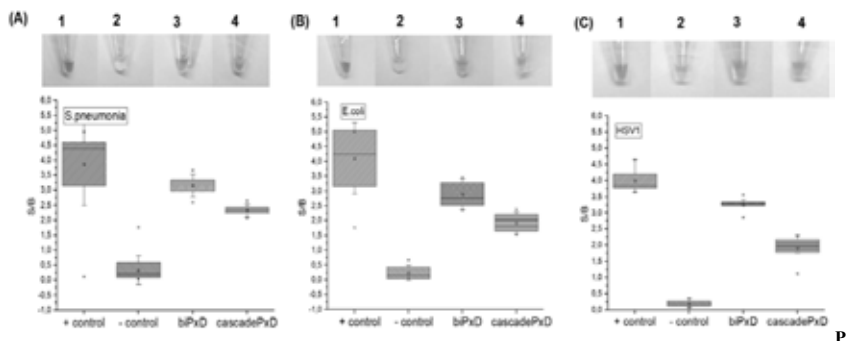


Рис. 3. Визуальное обнаружение ампликонов *S. pneumoniae*, *E. coli* и HSV1 с помощью бинарного пероксидазоподобного Dz (biPxD) или каскада РНК-расщепления и пероксидазоподобного Dz (cascade PxD) в сравнении с положительным (и отрицательный контроль (смесь NASBA без бактериальной РНК)). (А) Визуализация изменения цвета в положительном / отрицательном контроле. Реакционные смеси содержали продукты NASBA после амплификации 10 клеток *S. pneumoniae*. (В) Визуализация изменения цвета в положительном / отрицательном контроле, реакционные смеси, содержащие NASBA, после амплификации 10 клеток *E. coli*. (С) Визуализация изменения цвета в положительных / отрицательных контролях, реакционных смесях, содержащих NASBA, после амплификации около 10 клеток HSV 1. Измерения отношения сигнал / фон положительного / отрицательного контролей и обнаружение продуктов NASBA в режиме biPxD и cascadePxD

вирусной РНК образцы нагревали при 95°C перед инкубацией и охлаждали до комнатной температуры чтобы позволить PDz сформировать структуру G-квадруплекса. Наконец, добавляли 62,5 нМ гемина, 1 мкМ DAB и 1 мкМ H₂O₂. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин с последующим визуальным анализом и измерением оптической плотности ($\lambda = 500$ nm). Окрашивание от бесцветного до коричневатого и увеличение отношения сигнал / фон в ~ 5 или более раз оценивали как положительный результат, указывающий на присутствие РНК-мишени.

Результаты. В этой работе мы адаптировали предложенный ранее [8] гибридизационный зонд для визуального обнаружения патогенов различного происхождения (*E. coli*, *S. pneumoniae*, HSV1).

Время обнаружения было значительно сокращено: с учетом времени, необходимого для микробиологических манипуляций, реакции NASBA и визуального обнаружения, общее время обнаружения составило менее 2 часов. Для метода требуется только обычная водяная баня (термоблок, термопак).

Согласно серийным разведениям, предел обнаружения системы составляет всего 10 бактериальных (*E. coli* или *S. pneumoniae*) клеток. Затруднительно точно определить предел обнаружения в случае ампликонов вирусной РНК, так как система распознает продуцируемую мРНК, но не вирусные частицы. Согласно серийным разведениям всей экстрагированной РНК, по нашим оценкам, это также составляет около 10 инфицированных клеток.

Список литературы

1. Fogel R., Limson, J. and Seshia A.A., «Acoustic biosensors», *Essays Biochem*, 60(1), 101–110 (2016).
2. Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J. and Reimhult E., «Electrochemical Biosensors — Sensor Principles and Architectures», *Sensors*, 8, 1400-1458, (2008).
3. Damborský P., Švitel J., and Katrlík J., «Optical Biosensors», *Essays Biochem*, 30, 60(1), 91–100, (2016).
4. Bengt Danielsson, «Calorimetric biosensors», *Journal of Biotechnology*, 15(3), 187-2001, (1990).
5. Mothershed, E. A., Whitney, A. M. «Nucleic Acid-Based Methods for the Detection of Bacterial Pathogens: Present and Future Considerations for the Clinical Laboratory», *Clin. Chim. Acta*, 363, 206-220, (2006).
6. Wahl, B. O'Brien K., Greenbaum A., Majumder A., Liu L., Chu M. et al. «Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15», *The lancet: global health* 6(7), 744-757, (2018).
7. Looker K. J, Magaret A. S., May M. T., Turner K. M. E., Vickerman P., Newman L. M., and . Gottlieb S. L, «First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection», 5(3), 300–309, (2017).
8. Kolpashchikov. D. M., «Split DNA Enzyme for Visual Single Nucleotide Polymorphism Typing», *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 2934–2935, (2008).
9. Gerasimova Y.V., Cornett E.M., Edwards E., Su X., Rohde K.H., Kolpashchikov D.M., «Deoxyribozyme Cascade for Visual Detection of Bacterial RNA», *Chembiochem*, 14(16), p.2087-90, (2013).

УДК 616.611-002

*Завьялова О.А.¹, Алмазова Е.В.², Горелова А.Е.³,
Абаленихина Ю.В.⁴, Оськина Л.Д.⁵
ФГБОУ ВО РязГМУ^{1,2,3,4} Минздрава России, Рязань,
ГБУ РО «ГКБ № 11»⁵ Рязани, Рязань
olga.zavyalova.1999@mail.ru¹, abalenihipina88@mail.ru⁴*

Оценка степени окислительного стресса в сыворотке крови пациентов с гломерулярным повреждением почек

В работе проведена оценка окислительного стресса у пациентов с гломерулярным повреждением почек. Получено, что уровень карбонильных производных белков и ТБК-реактивных продуктов статистически значимо возрастает в группе пациентов по сравнению со значениями контрольной группы.

***Ключевые слова:** окислительный стресс, гломерулярное повреждение почек, продукты перекисного окисления липидов, карбонильные производные белков.*

*Zavyalova O.A., Almazova E.V., Gorelova A.E.,
Abalenikhina Yu.V., Oskina L.D.
Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia
Ryazan Clinical Hospital, Ryazan, Russia*

Assessment of the degree of oxidative stress in the blood serum of patients with glomerular kidney damage

The study evaluated oxidative stress in patients with glomerular renal injury. It was found that the level of carbonyl derivatives of proteins and TBA-reactive products statistically significantly increased in the group of patients compared with the values of the control group.

***Key words:** oxidative stress, glomerular kidney injury, lipid peroxidation products, carbonyl derivatives of proteins.*

Под окислительным стрессом понимают состояние, при котором в организме образуется достаточно высокое количество свободных радикалов. В условиях абсолютного здоровья их внутриклеточное содержание поддерживается на низком уровне различными системами организма – участниками редокс-гомеостаза, таким образом, окислительный стресс может быть рассмотрен как дисбаланс между про- и антиоксидантными системами [1, 3].

В организме при различных патологиях увеличивается количество свободных радикалов, что связано с изменением различных микро- и макромолекул при действии неблагоприятных факторов внешней и

внутренней среды. В настоящее время установлено, что при развитии любой патологии свободные радикалы играют решающую роль в течении заболевания, его разрешении, а также развитии возможных осложнений, они повреждают белки, липиды, изменяя свойства различных органелл клетки, в состав которых они входят [6].

В России ежегодно увеличивается количество случаев заболеваемости различными болезнями почек и мочевыводящих путей. Согласно данным статистики в 2003 году число заболевших составило 1 023 659 человек, а в 2013 году – 2 244 069, таким образом за 10 лет прирост составил 108,8%. Из этого числа 31% приходится на хроническую или острую форму гломерулонефрита. В развитии этой патологии также важную роль играет окислительный стресс, образуется характерный для данного заболевания количественный и качественный состав изменений, который можно определить и в последующем регулировать [9].

Таким образом, целью исследования является определение показателей окислительного стресса, характерных для больных с гломерулярной патологией по сравнению с донорами.

Материалы и методы. Обследованы 20 доноров и 16 пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом хронического гломерулонефрита. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании и использовании их биопроб. Для биохимического анализа степени окислительного стресса использовали сыворотку крови доноров и пациентов.

Для биохимического анализа использовали набор реактивов (Protein Carbonyl Content Assay Kit, Sigma, Германия). Содержание карбониллов в сыворотке крови определяли деривацией карбонильных групп белка 2,4-динитрофенилгидразином (DNPH), приводящей к образованию стабильных аддуктов динитрофенилгидразона (DNP), которые регистрировали спектрофотометрически при 375 нм на микропланшетном анализаторе StatFax 3200 (AwarenessTechnology, США), пропорционально присутствующим карбонилам. Содержание карбонильных производных белков выражали в е.о.п./г белка [5, 7]. Биохимический анализ продуктов перекисного окисления липидов проводили в сыворотке крови с использованием коммерческого набора «ТБК Агат», Россия. Оптическую плотность образцов определяли при длинах волн 535 и 570 нм на спектрофотометре СФ-2000 (Санкт-Петербург).

Статистический анализ результатов экспериментального исследования проводился с использованием программы Statistica 10,0. Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Результаты представлены

в формате Me [min; max], где Me- медиана, max – максимальное значение и min – минимальное. Для анализа статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест). Критический уровень статистической значимости различий нулевой гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты. Доноры и пациенты клинической группы были сопоставимы по полу и возрасту, сопутствующей патологией.

Таблица 1. Клиническая характеристика исследуемых групп

Показатель, единица измерения	Группа А (доноры)	Группа В (пациенты)
Количество пациентов, n	20	20
Возраст, годы	44,9±3,4	45,3±2,8
Мужчины, n	10 (50%)	12 (60%)
Женщины, n	10 (50%)	8 (40%)
Заболевание, морфологическая форма		
Фокально-сегментарный гломерулосклероз	0 (0%)	10 (50%)
Мембранозная нефропатия	0 (0%)	10 (50%)
Морфологическое исследование у пациентов, n		
Биопсия почечной ткани	0 (0%)	16 (80%)
Отсутствие морфологического исследования	0 (0%)	4 (20%)
Исходная анатомо-морфологическая характеристика, результаты УЗИ		
Контур нечеткий. Rs: 138*70 мм, ТСП 22-23 мм. Эхогенность паренхиматозного слоя повышена. ЧЛС не расширена с обеих сторон. Конкременты с средней трети размером 4 мм.	0 (0%)	12 (60%)
Контур нечеткий. RD 122*47. ТСП 15 мм. ЧЛС до 10 мм.	0 (0%)	4 (20%)
Нормальная анатомо-морфологическая характеристика	4 (20%)	0 (0%)
Не проводилось	16 (80%)	4 (20%)
Биохимические показатели мочи и крови		
Лейкоциты крови, *10 ⁹	5,6±2,3	9,3±4,65
Лейкоциты мочи, * 10 ⁹	2±1	6±3

Показатель, единица измерения	Группа А (доноры)	Группа В (пациенты)
Общий белок, г/л	40-49	47-52
Удельный вес мочи	1012±2	1019±5
Реакция мочи	Кислая	Нейтральная, кислая
Альбумины, г/л	39±4	20±4
Сопутствующие заболевания		
Гипертоническая болезнь	8 (40%)	12 (60%)
Подагра	0 (0%)	4 (20%)
Снижение толерантности к углеводам	8 (40%)	16 (80%)
Хроническая сердечная недостаточность	4 (20%)	4 (20%)

Свободные радикалы генерируют процесс перекисного окисления липидов в организме, продукты которого образуют с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) окрашенный комплекс, экстрагируемый бутанолом, являющийся маркером повреждения липидов [2].

При определении концентрации ТБК-реактивных продуктов было установлено, что их концентрация значительно превышает показания доноров. Однако статистически значимых различий в концентрации ТБК между пациентами с мембранозной нефропатией и фокально-сегментарным гломерулосклерозом не обнаружено.

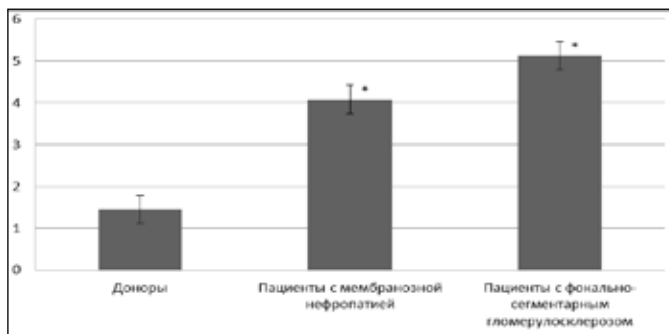


Рис. 1. Концентрация ТБК-реактивных продуктов у доноров, пациентов с мембранозной нефропатией и фокально-сегментарным гломерулосклерозом

Таблица 2. Концентрация карбонильных производных белков у доноров, пациентов с мембранозной нефропатией и фокально-сегментарным гломерулосклерозом (M±S)

	Доноры (n=20)	Пациенты с диагнозом мембранозная нефропатия (n=10)	Пациенты с диагнозом фокально-сегментарный гломерулосклероз (n=10)
Уровень карбонильных производных белков, е.о.п./г белка	19,47±1,73	49,06±6,77*	57,13±7,16*
АДНФГ, е.о.п./г белка	12,23±1,64	33,58±3,81*	19,84±3,89
КДНФГ, е.о.п./г белка	7,24±0,69	15,47±3,29*	37,29±4,02*
Доля первичных маркеров, %	62,65±4,21	68,63±2,69	34,72±2,79*
Доля вторичных маркеров, %	37,34±4,22	31,36±2,68	65,27±2,57*

У пациентов с гломерулярной патологией уровень карбонильных производных белков возрастает, содержание АДНФГ и КДНФГ увеличивается в большей степени по сравнению с группой контроля, что свидетельствует о развитии окислительного стресса [10].

Уровень карбонильных производных белков у пациентов с мембранозной нефропатией возрастает, но содержание АДНФГ и КДНФГ увеличивается в равной степени. Вследствие этого, можно говорить о том, что усугубление окислительных процессов не происходит.

Однако у пациентов с фокально-сегментарным гломерулосклерозом значительно увеличивается концентрация КДНФГ. Преобладание вторичных маркеров окислительного стресса у пациентов с фокально-сегментарным гломерулосклерозом свидетельствует об усугублении окислительных процессов при данной патологии.

Вывод. Таким образом, протекание мембранозной нефропатии и фокально-сегментарного гломерулосклероза происходит на фоне окислительного стресса, что сопровождается окислением липидов и белков.

Список литературы

1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биологические аспекты [Текст]/ Е.Е. Дубинина. Санкт-Петербург: Изд-во «Медицинская пресса», 2006. 400 с.
2. Источники и мишени свободных радикалов в крови человека: монография / под. Ред. Ю.А. Владимирова. Москва: МАКС Пресс, 2017. 304 с
3. Лушак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма [Текст]/ В.И. Лушак // Биохимия. 2007. Т.72, вып. 8. С. 995-1017.
4. Окислительная модификация белков и изменение активности катепсинаL селезенки крыс в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота/ Ю.В. Абаленихина [и др.]// Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. 2013. №1. С. 45-49.
5. Свидетельство №2020611566 РФ. Программа определения уровня карбонильных производных белков и резервно-адаптационного потенциала в норме и при патологии / Абаленихин А.А., Абаленихина Ю.В., Груздев Е.Е. // Ряз.гос.мед.ун-т им. И.П. Павлова. 2020610592; заявл. 27.01.2020; опубли. 04.02.2020.
6. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях [Текст] /Ю.И. Губский[и др.] // Совр. пробл. токсикологии.- 2005. Т.8, №3. С. 20-27.
7. Фомина М.А. Способы комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина; ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. Рязань: РИО РязГМУ, 2014. 60 с.
8. Agarwal S. Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging [Text] // S. Agarwal, R.S. Sohal // Mech Ageing Dev. 1995. Vol. 161, №1. –P. 55-63
9. Colak E. New markers of oxidative damage to macromolecules [Text] / E. Colak // JMB. 2008. P. 1-16.
10. Stadman E.R. Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability [Text] / E.R. Stadman // Methods Enzymol. 1995. Vol.258. P. 379-393

Газохроматографическая оценка эффективности лечения рахита у детей

В работе выявлено, что при рахите у детей имеются значительные нарушения содержания жирных кислот. Для коррекции дисметаболизма высших жирных кислот наряду с традиционной терапией рекомендуется назначение абрикосового масла и аевита, что обеспечивает высокую эффективность терапии у детей с рахитом.

Ключевые слова: рахит, дисметаболизм, жирные кислоты, абрикосовое масло, аевит, традиционное лечение, модифицированный метод лечения.

Ibatova Sh.M., Mukhamadiev N.K.
Samarkand State Medical Institute, Uzbekistan

Gas chromatographic evaluation of the effectiveness of treatment of rachitis in children

The work revealed that with rickets in children there are significant violations of the content of fatty acids. To correct the dismetabolism of higher fatty acids, along with traditional therapy, it is recommended to prescribe apricot oil and aevit, which ensures high effectiveness of therapy in children with rickets.

Key words: rickets, dismetabolism, fatty acids, apricot oil, aevit, traditional treatment, modified method of treatment.

Актуальность. В последние годы газовая хроматография является одной из методов определения маркеров метаболических процессов в организме человека. В этом плане особое место занимают жирные кислоты, определение которых легко выполняется методом газожидкостной хроматографии [1].

Нами разработана методика определения жирных кислот при различных патологических состояниях, которая включает подбор неподвижной фазы и оптимизация условий разделения [2,3]. Данная методика применена для изучения жирно-кислотного состава сыворотки крови у детей при различных патологиях и изучались особенности липидного обмена у больных с пузырьно-влагилищными свищами [4-10].

Рахит является не только педиатрической, но и медико-социальной проблемой, сущность которого заключается в нарушении

общего метаболизма, фосфорно-кальциевого, липидного обмена, расстройствами минерализации скелета и функционального состояния внутренних органов и систем [11-16]. Применение данной методики для оценки эффективности сочетанного применения растительного масла и антиоксидантов в комплексном лечении рахита является актуальной с точки зрения выбора корректирующей терапии.

Цель исследования. Газохроматографическая оценка эффективности применения абрикосового масла и аевита в комплексной терапии рахита у детей.

Материалы и методы исследования. Для выполнения поставленной цели нами обследовано 87 больных с рахитом. Из них 45 детей с рахитом, отягощенной пневмонией и гипотрофией, находящиеся на стационарном лечении в клинике №2 СамМИ. Контрольную группу составили 10 практически здоровых детей, которые наблюдались в детской поликлинике №1 г. Самарканда.

Состав высших жирных кислот в сыворотке крови у детей с рахитом определяли методом газожидкостной хроматографии [3]. Для идентификации разделенных метиловых эфиров жирных кислот использовали метод «свидетелей» и метод, основанный на структурно-групповых составляющих «сорбент-сорбат». В результате идентификации в сыворотке крови обнаружены следующие жирные кислоты: С(16:0) – пальмитиновая, С(16:1) – пальмитолеиновая, С(18:0) – стеариновая, С(18:1) – олеиновая, С(18:2) – линолевая, С(18:3) – линоленовая и С(20:4) – арахидоновая. Содержание жирных кислот определяли методом внутренней нормализации.

Результаты и их обсуждение. Обследованные больные были распределены на 2 группы. I группа детей (38 больных) с рахитом получали традиционный метод терапии. Результаты исследования представлены в таблице 2.

II группа обследованных детей с рахитом (49 больных) на фоне традиционного метода лечения получала абрикосовое масло и аевит. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Было проведено исследование состава высших жирных кислот в сыворотке крови у детей с рахитом (I группа – 38 больных детей с рахитом), находящихся на традиционном методе лечения и II группа (49 больных детей с рахитом) – при сочетании традиционного метода лечения с применением модифицированной терапии.

Полученные результаты по определению содержания высших жирных кислот в сыворотке крови детей с рахитом по сравнению с данными здоровых детей представлены в табл. 2.

Таблица 1. Состав и содержание жирных кислот сыворотки крови у детей с рахитом

Жирные кислоты	Контроль	При обследовании	p<
C (16:0)	28,17±1,37	30,87±1,53	0,01
C (16:1)	2,70±0,22	1,38±0,64	0,05
C (18:0)	26,13±1,32	28,03±1,04	0,01
C (18:1)	0,90±0,13	0,66±0,6	0,01
C (18:2)	33,32±2,51	29,73±2,34	0,05
C (18:3)	2,41±0,45	2,58±0,50	0,01
C (20:4)	3,56±0,60	2,68±0,60	0,01

Примечание: p – достоверность различия между показателями в группе больных и здоровых.

Таблица 2. Состав и содержание жирных кислот (в %) в сыворотке крови в зависимости от способа лечения

Жирные кислоты	Контроль	Метод лечения			
		Традиционный		Модифицированный	
		M±m	p<	M±m	p<
C (16:0)	28,17±1,37	28,96±1,28	0,01	28,21±1,31	0,1
C (16:1)	2,70±0,22	1,62, ±0,43	0,01	2,55±0,30	0,1
C (18:0)	26,13±1,32	27,67±0,82	0,20	26,75±0,80	0,1
C (18:1)	0,90±0,13	0,76±0,10	0,20	0,92±0,10	0,1
C (18:2)	33,32±2,51	30,74±2,10	0,50	33,12±1,80	0,1
C (18:3)	2,41±0,45	2,11±0,45	0,05	2,73±0,45	0,1
C (20:4)	3,56±0,60	2,10±0,51	0,05	3,26±0,40	0,1

Примечания: p – относительно здоровых

У обследованных детей, больных рахитом, получавших традиционное лечение, отмечался широкий диапазон колебаний изученных показателей липидного обмена.

По нашему мнению, липидный дисбаланс, обусловлен вероятно тем, что действие специфической терапии в организме в первую очередь направлена на коррекцию фосфорно-кальциевого обмена, поэтому не происходило нормализации изученных показателей липидного обмена, что требовало дальнейшей их коррекции.

Как видно из табл.2, что проведенный метод лечения показал свою высокую эффективность, что подтверждено полученными данными: С(16:0)-28,21±1,31%, С(16:1) – 2,55±0,30%, С(18:0) – 26,75±0,80%, С(18:1) – 0,92±0,10%, С(18:2) – 33,12±1,80%; С(18:3) – 2,73±0,45%; С(20:4) – 3,26± 0,40%, т.е. под влиянием модифицированного лечения показатели жирно-кислотного состава нормализовались у большинства больных.

Выводы. Выявлено, что при рахите у детей имеются значительные нарушения содержания жирных кислот. Для коррекции дисметаболизма высших жирных кислот наряду с традиционной терапией рекомендуется назначение абрикосового масла и аевита, что обеспечивает высокую эффективность терапии у детей с рахитом.

Список литературы

1. Акайзин Э. С., Кулагин В. Ф. Анализ количественного содержания летучих жирных кислот в диагностике гнойной инфекции у больных с осложненной травмой и в оценке эффективности лечения //Вестник Ивановской медицинской академии. 2017. Т. 22. №. 4. С. 57-58.
2. Mukhamadiev N. Q. et al. Optimization of separation on the basis of UNIFAC parameters and evaluation of the composition of the stationary phase in gas-liquid chromatography // Chromatographia. 2003. Т. 57. №. 11-12. С. 831-833.
3. Мухамадиев Н.К., Ибатова Ш.М., Эргашов И.М. Газохроматографическое визначення жирних кислот в сироватки крови детей, хворих на рахит //ПРАЦИ 2-го захидноукраїнського симпозиуму з адсорбції та хроматографії. Львів, 2000.- С. 211-214.
4. Пикуза О. И., Вахитов Х. М. Характеристика липидного обмена и процессов перексидации при различных клинических формах пневмонии у детей //Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2010. Т. 55. №. 2.

5. Скворцова В. А., Боровик Т. Э., Нетребенко О. К. Нарушения питания у детей раннего возраста //Лечащий врач. 2010. Т. 1. С. 36-41.
6. Нуриллаев Ж. Я., Мухамадиев Н. К. Особенности липидного обмена у больных с пузырьно-влагалищными свищами //Урология. 2007. №. 6. С. 36-39.
7. Ibatova Sh.M., Muhamadiev N.Q., Axmedov Sh.O., Muhamadiyeva S.N. Improvement of Vitamin-D deficient rachitis treatment in children // International Journal of Medicine & Health Research Published. 2015. N 1 (1). P. 1-5.
8. Ibatova S. M., Muhamadiev N. Q., Rabbimova D. T., Mamutova E. S., Abdukadirova N. B., Kadirova M. M. Gas-chromatographic appraisal of application of apricot oil and aevit in complex therapy of vitamin D-deficiency rickets in children // Theoretical & Applied Science. 2019. N 4. P. 333-336.
9. Ибатова Ш.М., Язданов А.Я., Хасанова Д. Абрикосовое масло как регулятор липазной активности сыворотки крови у детей с витамин D – дефицитным рахитом //Ж. Проблемы биологии и медицины. 2013. № 4 (75). С. 138-139.
10. Ибатова Ш.М., Маматкулова Ф.Х., Абдукадилова Н.Б., Облокулов Х.М., Ачилова Ф.А. Эффективность применения абрикосового масла у детей с рахитом // Научно-практический журнал «Вопросы науки и образования». 2019. №27 (76). С.40-46.
11. Неудахин Е.В., Агейкин А.В. Спорные теоретические и практические вопросы рахита у детей на современном этапе // Педиатрия. - 2003. N 4.-С. 95-98.
12. Захарова И. Н., Коровина Н. А., Дмитриева Ю. А. Роль метаболитов витамина D при рахите у детей // Педиатрия. Журнал им. ГН Сперанского. 2010. Т. 89. №. 3.
13. Захарова И. Н., Дмитриева Ю. А., Яблочкова С. В., Евсеева Е. А. Недостаточность и дефицит витамина D: что нового? // Вопросы современной педиатрии. 2014. Т.13. №.1. С.134-140
14. Захарова И.Н., Коровина Н.А., Боровик Т.Э., Дмитриева Ю.А. Рахит и гиповитаминоз D – новый взгляд на давно существующую проблему / Пособие для врачей. Москва, 2011.-96 с.
15. Захарова И.Н., Коровина Н.А., Дмитриева Ю.А. Роль метаболитов витамина D при рахите у детей // Педиатрия. 2010. Т.89. №3. С.68-73.
16. Zakharova I.N., Dmitrieva Y.A. Vitamin D metabolism in children with rickets // Trace elements in medicine.-2010.-vol.II. №2. P.39-39.

Карпова Н.С., Дмитренко О.П.
ФГБУ НИИ ОПП РАН, Россия, Москва
nataliakarpova.sp@gmail.com, dolga6528@gmail.com

Использование результатов ассоциативных исследований в качестве факторов риска развития заболеваний, ассоциированных с возрастом, на примере возрастной макулярной дегенерации

Персонализированная медицина направлена на улучшение здравоохранения путем индивидуального подбора эффективных методов лечения на основе индивидуальной генетической характеристики. Сегодня в клинической практике изучаются и другие биомаркеры, такие как НАД-зависимые белки, обладающие деацетилазной активностью и полиморфные варианты кодирующих их генов, в частности rs12778366 SIRT1.

Ключевые слова: ВМД, SIRT1, rs12778366, ассоциативные исследования, фармакогенетика.

Karpova N.K., Dmitrenko O.P.
Federal State Budgetary Institution “Research Institute of Pathology and Pathophysiology”
Russia, Moscow

Using the results of associative studies as risk factors for the development of diseases associated with age, using the example of age-related macular degeneration

Personalized medicine aims to improve health care by individually selecting effective treatments based on individual’s genetic makeup. Today, other biomarkers are being studied in clinical practice, such as NAD-dependent proteins with deacetylase activity and polymorphic variants of the genes encoding them, in particular, rs12778366 SIRT1.

Key words: AMD, SIRT1, rs12778366, associative studies, pharmacogenetics.

Проект Геном человека приоткрыл двери к выявлению и пониманию роли факторов риска в развитии различных болезней в виде однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphism – SNP, полиморфизмы) [1]. В настоящее время выделяют три группы функционально значимых SNP, а именно cSNP, rSNP и sSNP, которые соответственно локализуются в кодирующих, регуляторных и критичных для сплайсинга областях генов человека. Некоторые из них

оказывают влияние на фенотип и проявляются на уровне изменений экспрессии генов, в структуре белков и их различных изоформ, а некоторые могут быть связаны с различными заболеваниями.

Известны полиморфные варианты, которые однозначно являются причинами развития ферментопатий, таких как фенилкетонурия (наиболее часто встречаются 7 SNP) [2]. Сложнее обстоит ситуация с полигенными заболеваниями, в основе развития которых лежат множество факторов рисков, как генетических, так и окружающей среды, часть из которых до конца не изучена и представляет проблемное поле для современных исследователей. В статье рассматриваются перспективы использования генотипирования SNP методом ПЦР в качестве средств диагностики и как они меняют современные подходы к раннему выявлению ассоциированных с возрастом заболеваний, таких как возрастная макулярная дегенерация (ВМД).

Наиболее распространенной причиной слепоты и слабовидения у пожилых людей является возрастная макулярная дегенерация – сложное многофакторное состояние, включающее в себя множество генетических, экологических и конституциональных факторов и характеризующееся поражением макулярной зоны сетчатки.

Заболевание представляет собой нейродегенеративный процесс с тенденцией к прогрессированию, поражающий хориокапиллярный слой сосудистой оболочки, мембраны Бруха, слой ретинального пигментного эпителия (РПЭ), что в конечном итоге приводит к гибели фоторецепторов макулярной зоны сетчатки [3, 4]. Несмотря на то, причины возникновения и механизм развития этого заболевания до настоящего времени в полной мере не выяснены, считается, что заболевание связано со старением организма и такими патологическими процессами, как окислительный стресс, воспаление, изменения внеклеточного матрикса, нарушение липидного обмена и аномальный рост новообразованных сосудов из капиллярной сети сетчатки [5, 6].

Для качественной диагностики заболевания применяются как традиционные диагностические методы (офтальмоскопия, визометрия), так и компьютеризированные и автоматизированные – компьютерная периметрия, визоконтрастометрия, флуоресцентная ангиография, цветное стереофотографирование, оптическая когерентная томография. Молекулярно-генетические тесты в свою очередь фактически не применяются в клинической практике, ввиду ряда причин. В исследовательских целях используются технологии полногеномного секвенирования и GWAS (Genome-Wide Association Studies), которые остаются до сих пор дорогостоящими, несмотря на постепенное удешевление, а также содержат избыточное количество данных, не

актуальных для конкретных диагностических целей. Поэтому в настоящее время для клинической практики перспективнее использовать таргетные ПЦР тесты, которые являются экономически выгодной и быстрой альтернативой. Использование генотипирования способно повысить прогностическую мощь, поскольку генотип не изменен в течение жизни и является объективным показателем, не подверженным изменениям под действием факторов окружающей среды, при этом взаимодействуя с ними. Это особенно актуально для заболеваний с поздней манифестацией, к которым относится ВМД. Раннее обнаружение генетических рисков может привести к более эффективным мерам профилактики. Некоторые изученные полиморфные варианты генов уже входят в состав предиктивных и диагностических тестов, демонстрируя актуальность данной стратегии и ее эффективности в клинической практике. Среди отрицательных сторон использования SNPs в качестве прогностических и диагностических предикторов необходимо упомянуть трудности надежной оценки выраженности эффектов каждого из ассоциированных SNPs, а также то, что отдельный высоко ассоциированный полиморфизм может быть ненадежным фактором прогнозирования рисков [7].

Кроме того, подобные исследования позволяют выявлять полиморфные варианты, обеспечивающих специфический ответ у пациентов на различные лекарственные препараты. Park U. C. с соавторами обнаружили, что в корейской когорте результаты лечения неоваскулярной ВМД с помощью анти-VEGF различались в зависимости от генотипов rs3025039 VEGFA, rs10490924 ARMS2 и rs11200638 HTRA1, что доказывает важность и перспективность развития персонализированных терапевтических подходов, основанных на результатах таргетного генетического скрининга [8]. Возможность подбора препаратов на основе генетического скрининга с дальнейшим мониторингом состояния пациента позволяет минимизировать сроки без длительной коррекции. Например, в последнее время генетический скрининг гена DPYD все чаще используется в онкологии, до начала лечения, во избежание токсичности от препаратов фторпиримидина [9].

Возрастная макулярная дегенерация является полигенным заболеванием, при котором генетические факторы, а также факторы окружающей среды и образа жизни способствуют влияют на риск развития заболевания, причем роль генетических факторов, объясняет до 71% вариабельности заболевания [10]. Исследования близнецовым и семейным методами позволили предположить роль генетических факторов в комбинации с влиянием окружающей среды при ВМД,

став стартовой площадкой для масштабных ассоциативных исследований [11]. Однако, они в значительной степени сложны при таких мультифакторных заболеваниях, как ВМД. В 2005 году впервые выявлена значимая связь между заболеванием и SNP в гене фактора комплемента H (CFH), что стало несомненным прорывом в понимании влияния полиморфных вариантов генов на развитие ВМД. На сегодняшний день по данным международного консорциума генома ВМД (The International AMD Genomics Consortium) идентифицировано 52 генетических варианта, ассоциированных с повышенным риском развития как географической атрофии, так и хориоидальной неоваскуляризации на поздней стадии ВМД и локализованных в 34 локусах, 16 из которых ранее не ассоциировали с ВМД. Многие из полиморфизмов обнаружены в таких генах как ген CFH, CFB, C2, CFI, а также гена ARMS2. Данные триггеры активации комплемента включают C-реактивный белок и апоптоз клеток, а также активацию альтернативного пути из-за отсутствия ингибирования фактором H.

За счет изменений множества тонких белок-белковые взаимодействия на различных уровнях, обнаруживают все большее число белков и полиморфных вариантов, кодирующих их генов, вовлеченных в развитие различных патологий. Помимо генетических маркеров, для применения в клинической практике изучаются и другие биомаркеры, такие как НАД-зависимые белки, обладающие деацетилазной активностью, в частности SIRT1. SIRT1 относится к семейству гистоновых деацетилаз и представляет собой один из основных регуляторных факторов по контролю базовых биологических процессов, таких как клеточное старение, дифференцировка, воспалительные процессы [12]. SIRT1 играет роль универсального метаболического сенсора и реализует сигнал от соотношения $NAD^+/NADH$ метаболитов, отражающего состояние энергетического обмена в клетке, в каскад регуляторных сигналов через модификацию белков, участвующих в ремоделировании хроматина, подавлении транскрипции, целостности генома, делении клеток, энергетическом метаболизме и апоптозе [13].

Ген SIRT1 расположен в области q21.3 10-й хромосомы и является важным геном-кандидатом в иницировании развития ассоциированных с возрастом заболеваний. Предварительный анализ, исходя из подхода к генетическому картированию, основанному на выборе гена-кандидата, позволил нам предположить, что полиморфизм гена SIRT1 (rs12778366) может быть важной детерминантой развития ВМД. Z.Chen и др. показали, что rs12778366 SIRT1 ассоциирован с ВМД у гомозиготных носителей минорного аллеля С в китайской популяции Хань, R. Liutkeviciene и др. выявили близкую к статисти-

чески значимой ассоциацию rs12778366 с развитием ВМД в литовской популяции по аллелю С [14, 15]. По результатам нашего исследования выявлена ассоциация полиморфного локуса rs12778366 в гене SIRT1 с ВМД у гомозиготных носителей аллеля Т, что противоречит результатам предыдущих исследований. Это объясняется тем, что один генотип может быть защитным в одной популяции, в то же время как тот же самый генотип может увеличить вероятность развития заболевания в другой популяции. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения ассоциации полиморфизма rs12778366 в гене SIRT1 с ВМД с параллельным исследованием других генетических вариаций гена SIRT1, которые также могут оказывать влияние на развитие данной патологии.

Список литературы

1. Christodoulou J. The human genome project: opportunities, challenges and consequences for population screening //SOUTHEAST ASIAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND PUBLIC HEALTH. 2004. Т. 34. С. 234-238.
2. Liu X. et al. Multiple SNPs detection based on lateral flow assay for phenylketonuria diagnostic //Analytical chemistry. 2018. Т. 90. №. 5. С. 3430-3436.
3. Hyman L. et al. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration //Archives of ophthalmology. 2000. Т. 118. №. 3. С. 351-358.
4. Bhutto I., Luty G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex //Molecular aspects of medicine. 2012. Т. 33. №. 4. С. 295-317.
5. Nita M. et al. Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix //Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. 2014. Т. 20. С. 1003.
6. Kokotas H., Grigoriadou M., Petersen M. B. Age-related macular degeneration: genetic and clinical findings //Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2011. Т. 49. №. 4. С. 601-616.
7. Jakobsdottir J. et al. Interpretation of genetic association studies: markers with replicated highly significant odds ratios may be poor classifiers //PLoS genet. 2009. Т. 5. №. 2. С. e1000337.
8. Park U. C. et al. Pharmacogenetic associations with long-term response to anti-vascular endothelial growth factor treatment in neovascular AMD patients //Molecular vision. 2014. Т. 20. С. 1680

9. Weinshilbom RM, Wang L. Pharmacogenomics: Precision Medicine and Drug Response. Mayo Clin Proc. 2017;92(11):1711-1722. doi:10.1016/j.mayocp.2017.09.001

10. Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. Arch Ophthalmol. 2005;123:321–7

11. Priya R. R., Chew E. Y., Swaroop A. Genetic studies of age-related macular degeneration: lessons, challenges, and opportunities for disease management //Ophthalmology. 2012. Т. 119. №. 12. С. 2526-2536

12. Balaiya S., Abu-Amero K. K., Kondkar A. A., Chalam K. V. (2017). Sirtuins expression and their role in retinal diseases. Oxid. Med. Cell. Longev. 2017:3187594. 10.1155/2017/3187594

13. Jalliffa C., Ameziane I., Dansault A., et al. Sirt1 involvement in rd10 mouse retinal degeneration. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2009;50(8):3562–3572. doi: 10.1167/iovs.08-2817

14. Chen Z, Zhai Y, Zhang W, Teng Y, Yao K. Single Nucleotide Polymorphisms of the Sirtuin 1 (SIRT1) Gene are Associated With age-Related Macular Degeneration in Chinese Han Individuals: A Case-Control Pilot Study. Medicine (Baltimore). 2015; 94: e2238

15. R. Liutkeviciene, A. Vilkeviciute, L. Kriauciuniene, and V. P. Deltuva, «SIRT1 rs12778366, FGFR2 rs2981582, STAT3 rs744166, LIPC rs10468017, rs493258 and LPL rs12678919 genotypes and haplotype evaluation in patients with age-related macular degeneration,» Gene, vol. 686, pp. 8–15, 2019

УДК 616

Малахова М.Я., Стюф И.Ю., Большакова Г.Д., Балакова Н.И., Жиленкова Ю.И., Зимина В.А., Зенина М.А., Карнич С.А., Качанова Е.В., Сяпина Т.В.

*Северо-Западный государственный медицинский университет им.И.И.Мечникова, кафедра клинической лабораторной диагностики
prof-malachova@mail.ru*

Особенности результатов лабораторных анализов у пациентов с COVID-19 при разной тяжести заболевания

Обсуждаются клиничко-лабораторные параметры крови больных с COVID-19. Особое внимание уделено трактовке прогностически значимых показателей, возможных механизмов их изменений при коронавирусной инфекции в разные периоды болезни и при разной тяжести заболевания.

Ключевые слова: COVID-19, клинический анализ крови, дегенеративный ядерный сдвиг формулы влево, лактатдегидрогеназа, ферритин, D-димер, С-реактивный белок, иммуноглобулины.

**Malahova M.Ya., Styuf I.Yu., Bol'shakova G.D.,
Balakova N.I., Zhilenkova Yu.I., Zimina V.A., Zenina M.A.,
Karpich S.A., Kachanova E.V., Syasina T.V.**
*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg, Russia*

Laboratory features in patients with COVID-19 with varying severity of the disease

Clinical and laboratory parameters of patients with COVID-19 are discussed. Particular attention is paid to the interpretation of predictably significant indicators, possible mechanisms of their changes in coronavirus infection.

Key words: COVID-19, clinical blood test, degenerative nuclear change of formula to the left, laboratory tests; prognosis lactatedehydrogenase, ferritin, D-dimer, C-reactive protein, immunoglobulins.

В феврале 2020 г Всемирная Организация Здравоохранения, ориентируясь на Международный комитет по таксономии вирусов, присвоила официальное название инфекции вызванной возбудителем – SARS-CoV-2, именуемой COVID-19. Достаточно быстро появилось ряд нормативно-правовых документов Минздрава России и Роспотребнадзора, в которых перед специалистами клинической лабораторной диагностики были поставлены задачи, связанные, прежде всего, с быстрой и точной диагностикой COVID-19 в разные периоды заболевания и его осложнениями [1,2]. Согласно указаниям временных методических рекомендаций (профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19 версия 8 от 03.09.2020) изданным МЗ РФ в разделе 4 обозначены параметры диагностики коронавирусной инфекции: алгоритм обследования, его лабораторная диагностика и дифференциальная диагностика COVID-19 [3].

Лабораторная диагностика прежде всего направлена на установление диагноза: обнаружение РНК SARS-CoV-2, выявление антигена SARS-CoV-2, иммуноглобулинов классов А, М, G (IgA, IgM и IgG) к SARS-CoV-2.

Клиническая лабораторная диагностика охватывает общий клинический анализ крови: количество эритроцитов, концентрацию гемо-

глобина, гематокрита, количество лейкоцитов, количество тромбоцитов, лейкоцитарную формулу крови. В биохимический анализ крови включены: концентрация мочевины и креатинина, электролиты, концентрация глюкозы, АлАТ, АсАТ, билирубин, альбумин, лактат, ЛДГ, тропонин, ферритин, С-реактивный белок, прокальцитонин, мозговой натрий-уретический пептид – NT-proBNP/BNP и коагулограмма. Коллектив авторов методических рекомендаций учитывал опыт как российских, так и зарубежных клиник, опубликованный в многочисленных статьях.

Начнем с клинического анализа крови. Лечебный алгоритм, предложенный А.Г. Чучалиным, включает две фазы развития заболевания: 1 фаза заболевания – вирусемия, продолжается 1-14 дней, 2-я фаза – период вирус-бактериальной пневмонии – 10-20 дней и т.д до развития респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и септического шока.

Каждая фаза заболевания вносит свои коррективы в изменения параметров крови, отражая течение инфекции. Giuseppe Lippi and Mario Plebani [4] скрупулезно проанализировали более 10 публикаций, выделили наиболее репрезентативные лабораторные отклонения в клинических анализах крови и оценили их прогностические значения. Наблюдается увеличение количества лейкоцитов (в 1,5 – 2 раза) и нейтрофилов (1,7 – 4,4 раза) и снижение количества лимфоцитов (0,9- 1.1раза).

У пациентов, находящихся в тяжелом состоянии в реанимации, по сравнению с больными COVID-19 средней тяжести течения наблюдалось в 1,5 раза повышенное число лейкоцитов, имелась тенденция к росту числа нейтрофилов – $11,6 \times 10^9/\text{л}$ (медиана пикового значения), у 83,2% пациентов выявлена лимфоцитопения, у 36,2% – тромбоцитопения [6,7]. У пациентов с летальными исходом, также наблюдали лимфоцитопению и лейкоцитоз.

У 452 больных с установленным диагнозом коронавирусная инфекция (средняя тяжесть) отношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR) (5,5 против 3,2; $p < 0,001$) было достоверно высоким, отмечалось более низкое относительное количество моноцитов (6,6 против 8,4%; $p < 0,001$), эозинофилов (0,0 против 0,2%; $p < 0,001$) и базофилов (0,1 против 0,2%; $p = 0,015$) [5].

В процессе оказания консультативной помощи некоторым лабораториям СПб, было выявлено, что у больных с коронавирусной инфекцией в ответ на вирусную интоксикацию возникает лейкомоидная реакция с палочко-ядерным дегенеративным сдвигом. Такой тип ответа наблюдался при других вирусных заболеваниях с той разницей,

что повышения нейтрофилов при COVID-19, не было. Наблюдались как лейкоцитопения, так и лейкоцитоз, как указано и у других авторов [4,6,7], а сочетание лимфопении и палочко-ядерного дегенеративного сдвига отражающих терминальную стадию угнетения кроветворения можно считать, по нашему мнению, прогностическим признаком при COVID-19.

Рассмотрим конкретные данные, приведенные Guan, Wei-Jie, et al, [8] в работе касающейся, в основном, периода вирусемии: лейкопения — 34%, лимфопения — 82%, тромбоцитопения от 2% до 36%, СРБ выше 10 мг/л — 61%, ЛДГ выше 250 Ед/л — 42%, повышение D-димера — 46%. повышение АсТ, АлТ — 43%, повышение ферритина — 86%, повышение прокальцитонина — 6%. Уровень гемоглобина у таких пациентов существенно снижен.

Обращает на себя внимание, что в период вирусемии снижены эритроциты и нейтрофилы. Каждый из этих форменных элементов на данный момент выполняет свою функцию: нейтрофилы мигрируют в очаг воспаления, их количество в русле крови снижается; эритроциты подвергаются агрессии коронавируса, многие разрушаются, железо оказывается в плазме крови. Это явилось причиной снижения количества эритроцитов и гемоглобина, что и отразилось в клиническом анализе крови. На разрушение эритроцитов и попадание свободного гемоглобина в плазму среагировали тромбоциты, образовались микротромбы, что привело к развитию тромботической микроангиопатии [21].

Результаты полученных анализов поражают своим разнообразием, прежде всего, по разбросу количественных параметров и быстротой изменчивости за короткое время, однако они согласуются с лечебным алгоритмом, предложенным А.Г. Чучалиным: по мере присоединения микробной инфекции растет количество лейкоцитов, особенно нейтрофилов, что характерно для 2-й фазы — периода вирус-бактериальной пневмонии вплоть до развития респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и септического шока. Нейтрофилы содержат лейкоцитарную эластазу, катепсин G и, разрушаясь в очаге воспаления, ферменты протеолиза оказываются в крови, повышая протеолитический потенциал и разрушая белки плазмы крови (особенно альбумин, фибриноген). Мощности антипротеаз (альфа-1 и альфа-2 фракции белков плазмы крови), вырабатываемых в том числе и легочной тканью, в условиях тяжелой вирусной инфекции может быть недостаточно, поэтому больные с высоким нейтрофилёзом погибают чаще от эндогенной интоксикации возникающей вследствие разрушения белков плазмы крови — альбумина и фибриногена [9,10]

и появлению среднемолекулярных пептидов с токсическими свойствами. Недавнее исследование ученых Льежского университета в Бельгии подтверждают наши предположения о высоком протеолитическом потенциале артериальной крови. Они нашли ДНК-ловушки (англ. DNA traps) в легких пациентов, умерших от COVID-19 [11]. Нетоз – реакция нейтрофилов (возможно и макрофагов) как первая линия защиты от инфекции, заключается в том, что они выпускают свою собственную ДНК, протеолитические ферменты (эластазу, катепсин G) и как сеть накрывают агрессора. При массовом высвобождении такие ДНК-ловушки, используемые организмом в борьбе с вирусами, могут вызвать повреждения тканей, приводя к тяжелым осложнениям для организма в целом (и развитию цитокинового шторма).

Можно сделать вывод: высокое количество нейтрофилов при коронавирусной инфекции приводит к высокому протеолитическому потенциалу в артериальной крови и требует введения больному большого количества антипротеаз (контрикал, дорназа альфа), из всех показателей именно лимфопению в сочетании с палочкоядерным дегенеративным сдвигом можно считать наиболее важным прогностическим показателем исхода COVID-19.

Вероятно, следующим прогностическим показателем COVID-19 следует считать концентрацию ферритина в плазме крови. Свободное железо в крови весьма токсично, белок ферритин собирает его, и концентрация ферритина естественно повышается. Снижение концентрации ферритина при тяжелой форме заболевания у выживших происходит крайне медленно, постепенно снижаясь в течение нескольких (3-х и более) месяцев (личное наблюдение).

При средней тяжести заболевания иногда возникает парадоксальная ситуация – значительное повышение концентрации билирубина при нормальных показателях АлАТ и АсАТ. Такое повышение билирубина на ранней стадии коронавирусной инфекции объясняется не гибелью гепатоцитов, а разрушением большого количества эритроцитов. Гем эритроцитов оказывается в крови – его судьба – превратиться в билирубин и вместе с желчью покинуть организм.

В перечне рекомендаций указывается определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ), фермента углеводного обмена, участвующего в обратной реакции «лактат – пируват». Большинство тканей содержит ЛДГ и повышение фермента характерно для многих заболеваний, но наиболее часто наблюдается при поражениях печени, сердца и легких. При пневмониях увеличение концентрации ЛДГ может и не происходить, но в случаях эмболии сосудов легочной ткани, что типично для COVID-19, уровень фермента может возрасти значительно. При

коронавирусной инфекции поражается эндотелий сосудов многих органов и тканей и ЛДГ может в целом указывать на прогрессирующее COVID-19 и развитие осложнений.

Одним из грозных осложнений COVID-19 является диссеминированное внутрисосудистое свёртывание крови (ДВС-синдром), именно по этой причине в перечень необходимых анализов включен показатель d-димер с целью исключения или подтверждения нарушения свертывающей системы крови и ДВС-синдрома. Атака эритроцитов вирусом SARS-CoV-2 происходит, прежде всего, в артериальном сосудистом русле малого круга кровообращения. Размножение вируса может происходить в любых клетках, там, где есть рецепторы ангиотензин-превращающего фермента (АФП–рецепторы, в сосудах более всего). На мембране эритроцитов они не обнаружены, но есть другие белки тропные к коронавирусу (пять путей переноса информации патогенного коронавируса в клетку хозяина изложены в сообщении А.Симбирцева и А.Тоголяна – [12]). SARS COV-2 нарушить структуру эритроцита, но размножиться в этой клетке, он не сможет. Эритроцит имеет белок (альфа и бета – цепи Hb), который можно использовать для строения вируса, но он не имеет ядра и митохондрий – энергии и условий для синтеза новых SARS-CoV-2 нет. Китайские ученые Liu Wenzhong (Сычуаньский университет) и Li Hualan (Ибиньский университет) подтвердили, что вирус SARS-CoV-2 может атаковать эритроциты человека, связываясь с молекулами гемоглобина [13]. Они показали, что нет непосредственного контакта SARS-CoV-2 с эритроцитами, а вот неструктурные протеины вируса проникают внутрь эритроцитов и вытесняют железо из порфириновых ядер, что приводит к гипоксемии, развитию симптомов острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и полиорганной кислородной недостаточности. Механизм связывания вирусных белков, описанный Liu Wenzhong и Li Hualan, объясняет тот факт, что дети легче переносят коронавирусную инфекцию. Вирусные белки вызывают диссоциацию железа через взаимодействие с бета-цепью гемоглобина, которая является структурной единицей нормального гемоглобина взрослого человека (2 α и 2 β цепи). У детей до 3-4 мес. в крови преобладает фетальный гемоглобин HbF, который пока не содержит бета-цепей (2 α и 2 γ цепи) и, вероятно, неуязвим для вирусных белков. Подобный механизм возможен и у лиц с талассемией – генетическим заболеванием, у носителей которого синтезируется мутантный гемоглобин без бета-цепей.

Во всяком случае, каков бы ни был механизм взаимодействия SARS-CoV-2 с эритроцитами, последний нарушается, вероятно, реагируют тромбоциты и запускают свертывающую систему крови –

отсюда – микротромбы во всей артериальной сосудистой системе (тромботическая микроангиопатия – [21]). Далее запускается процесс лизирования тромбов, состоящих из фибрина и тромбина, плазмином, который запускает процесс фибринолиза, сопровождающийся образованием Д-димеров. Однако возможен и другой механизм образования Д-димеров, связанный с высокой протеолитической активностью плазмы и зависящий от разрушающихся в гнойных очагах легких нейтрофилов. Нейтрофильная эластаза и катепсин G лизируют фибриноген в венозной плазме и в итоге повышается концентрация Д-димера. Было бы более правильно определять Д-димер артериальной крови, чтобы быстрее регистрировать ОРДС. Анализ на Д-димер может быть ложноотрицательным, если произведен слишком ранний забор венозной крови или антикоагулянтная терапия уже назначена.

Повышение уровня С-реактивного белка (СРБ) – раннего классического маркера микробного воспаления, который незначительно повышался при других вирусных инфекциях – при коронавирусных агрессиях стал прогностически значимым показателем. Wang L [14] на 4-х группах больных с COVID-19 (легкая, умеренная, тяжелая и критическая группа) определяя СРБ и площадь поражения легочной ткани пришел к выводу, что уровень СРБ положительно коррелировал с площадью поражения легких и тяжестью течения заболевания (коэффициент корреляции=0,873, 0,734, P0. 001).

Как на одну из возможных причин повышения СРБ при коронавирусных заболеваниях указывают на «цитокиновый шторм» и появляющиеся в значительном количестве воспалительные цитокины [15].

Неконтролируемые, неуправляемые цитокины способны, по мнению Vasileva D. И Badawi A. [16] повреждать ткань легких и провоцировать выработку СРБ. Уровни СРБ у пациентов с COVID-19 имели прямую корреляцию с тяжестью и прогрессированием заболевания: низкие уровни СРБ (1-20 мг/л) наблюдали у больных без выраженной гипоксии, а при гипоксемии – уровни СРБ были достоверно выше (48-98 мг/л) [17]. Сравнение уровней СРБ с риском смертности показало, что у выживших пациентов средний уровень СРБ составлял ~ 40 мг/л, а у умерших 125 мг/л, что позволило авторам [18] исследования назвать СРБ предиктом летальности. Таким образом, раннее определение С-реактивного белка позволит дифференцировать больных по степени тяжести сразу же на стадии вирусемии.

Среди параметров диагностики коронавирусной инфекции COVID-19, поименованных в нормативно-правовых документах Минздрава России и Роспотребнадзора рекомендованы определение иммуноглобулины классов А, М, G (IgA, IgM и IgG) к SARS-CoV-2.

При инфицировании SARS-CoV-2 проведенные исследования показывают, что после появления первых симптомов COVID-19 антитела (АТ) появляются через неделю только у 30% пациентов. В течение 2-ой недели специфические АТ обнаруживаются у 70%, и самая высокая выявляемость была на 3-ей неделе (более 90% пациентов). [19]. Эти данные соответствуют той информации, которую можно найти в инструкциях фирм-производителей тест-систем к АТ против SARS.

К сожалению, мало статей содержат информацию об уровне специфических АТ у пациентов на сроке до 3-4 недель после появления первых симптомов COVID-19. Большинство пациентов, о которых идет речь в публикациях, находились в стационарах с COVID-19, поэтому, скорее всего, у них было более тяжелое заболевание, чем у людей со слабыми симптомами, которые не были госпитализированы. Следовательно, трудно сделать вывод об эффективности применения тест-систем на антитела для людей с более легкой болезнью или без симптомов. При легком течении коронавирусной инфекции у 63-х летней пациентки, симптоматика заболевания которой была слабо выражена, в сыворотке крови присутствовали IgM, а специфических IgG обнаружено не было (собственное наблюдение). Кроме того, тесты по обнаружению АТ дают ложноположительные результаты примерно в 2% случаев без COVID-19.

Опубликовано несколько работ, в которых представлены результаты анализов 400 пациентов, где показано, что у больных с более тяжелыми проявлениями COVID-19 обнаружены более высокие общие титры антител и титры антител класса IgG против SARS-CoV-2. Это связано с более тяжелыми исходами заболевания [цит.по12].

Возможно, в ряде случаев имеет место антитело-зависимое усиление инфицирования коронавирусом [20]. Не исключено также, что титры антител просто коррелируют с вирусной нагрузкой, не выполняя на ранних стадиях инфекции защитных функций, несмотря на немногочисленные доказательства о том, что в сыворотки от больных с подтвержденным COVID-19 нейтрализовали SARS-CoV-2 в культуральных тестах, так же как и лечение тяжелых больных сывороткой перенесших коронавирусную инфекцию [12].

Анализ литературных данных показывает, что тесты на антитела будут полезны большинству пациентов с COVID-19, но большое значение имеет временная точка, когда тесты были проведены. Тесты на антитела могут помочь подтвердить инфекцию COVID-19 у людей, которые имели симптомы в течение более двух недель и не проходили тест RT-PCR или имели отрицательные результаты теста RT-PCR.

Повышение различных лабораторных маркеров при COVID-19: нейтрофильный лейкоцитоз с лимфопенией, повышение уровня С-реактивного белка, ЛДГ, ферритина, D-димера, которые мы рассмотрели, как возможные прогностические лабораторные показатели характерные для развития ОРДС имеет смысл определять, во-первых, в комплексе, во-вторых, в артериальной крови. Тесты на антитела лучше выявляют COVID-19 у пациентов через две и более недель после начала симптомов, но пока не понятно, как долго сохраняется значимый уровень IgG. Надо отметить, что большинство исследований касается пациентов, получавших лечение в стационарах, и необходимы дальнейшие исследования для изучения комбинаций симптомов и лабораторных маркеров и тестирование разных групп населения, в учреждениях первичной помощи, а также детей и пожилых людей. Мы не затрагивали гемостаз при COVID-19 — основную систему, в которой происходят трагические процессы, зачастую приводящие больного к летальному исходу [21]. Эта тема обширна и требует написания отдельной статьи.

Список литературы

1. World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection when Novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected: Interim Guidance. 28 January 2020.
2. World Health Organization. Infection prevention and control guidance for long-term care facilities in the context of COVID-19: interim guidance, 21 March 2020. World Health Organization; 2020
3. Временные методические рекомендации (профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19. версия 8 от 03.09.
4. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Clin Chem Lab Med. 2020 Jun 25;58(7):1131-1134. doi: 10.1515/cclm-2020-0198.
5. S. Zhang, H. Li, S. Huang, Wei You, H. Sun //European Respiratory Journal 2020; DOI: 10.1183/13993003.00334-2020/
6. Chaolin Huang, Yeming Wang, Xingwang Li. et.al., Clinical feature of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China// Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497-506
7. Russell FM, Reyburn R, Chan J, Tuivaga E, Lim R, Lai J et al. Impact of the change in WHO's severe pneumonia case definition on hospitalized pneumonia epidemiology: case studies from six countries. Bull World Health Organ. 2019;97(6):386-93. Epub 2019/06/19. doi: 10.2471/BLT.18.223271. PubMed PMID: 31210676; PMCID: PMC6560369.

8. Guan, Wei-Jie, et al. Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in China. *MedRxiv* (2020).

9 Malakhova M., Obolensky S, Dmitrienko O., Meshkova M. Biochemical scening–test diagnostic of acute lungs pathology in emergency medicine.// *Acta Anaesthesiologia Scand.* 1993.,-Suppl.100.,vol.37.,p.230.

10. Malakhova M., Belyakov N. Obolensky S, Simbirtsev S.// Lung injury and endogenous intoxication: interrelation and sorption detoxication capacity. *Biomaterial artificial cells and artificial organs.* 1987, vol.15, -N3. P.395-404.

11. F.P. Veras, M.C.Pontelli, C. M. Silva et al. | SARS-CoV-2–triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology// *J.Exp. Med* (2020) 217 (12): e20201129.DOI:

12. <https://www.lspbgmu.ru/ru/obrazovanie/obuchenie-vrachej-pocovid-19>. Часть 6. Иммунопатогенез и перспективы иммунотерапии коронавирусной инфекции. А.С.Симбирцев, А.А.Тоголян

13. Wenzhong Liu, Hualan Li. COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism// архив препринтов *ChemRxiv* 2020.

14. Wang L. C-reactive Protein Levels in the Early Stage of COVID-19 // *Med Mal Infect.* 2020 Jun;50(4):332-334.

15. Warusevitane A., Karunatilake D., Sim J., Smith C., Roffe C. Early diagnosis of pneumonia in severe stroke: clinical features and the diagnostic role of C-reactive protein.// *PLoS one.* 2016;11(3):e0150269. doi: 10.1371/journal.pone.0150269. DOI – PMC – PubMed.

16. Vasileva D., Badawi A. C-reactive protein as a biomarker of severe H1N1 influenza// *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al, Bd.* 68, Nr. 1, S. 39–46, Jan. 2019, doi: 10.1007/s00011-018-1188-x.

17. B. E. Young u. a., Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore// *JAMA*, März 2020, doi: 10.1001/jama.2020.3204.

18. Q. Ruan, K. Yang, W. Wang, L. Jiang, und J. Song Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China// *Intensive Care Med.*, März 2020, doi: 10.1007/s00134-020-05991-x

19. Cochrane Database of Systematic Reviews, Тесты на антитела для идентификации текущей и перенесенной инфекции SARS-CoV-2.

20. Супотницкий М.В., Миронов А.Н., Лебединская Е.В. Феномен антителозависимого усиления инфекции у вакцинированных и переболевших // *Биопрепараты.* — 2013. — № 3. — С. 12–25.

21. F. Ciceri, L. Beretta, A. M. Scandroglio, S. Colombo at Microvascular COVID-19 lung vessels obstructive thromboinflammatory syndrome (MicroCLOTS): an atypical acute respiratory distress syndrome working hypothesis. 2020 Apr 15;22(2):95-97. Online ahead of print.

УДК 614.48

Мироненко О.В., Суворова О.К.
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ
Санкт-Петербург
miroolga@yandex.ru, suolko@gmail.com

Организация лабораторного производственного контроля технологий термического обезвреживания медицинских отходов классов «Б» и «В»

Определен и обоснован перечень показателей, при использовании технологий термического обезвреживания медицинских отходов классов Б и В в составе программы производственного контроля для обеспечения эпидемиологической безопасности в медицинской организации и для создания эффективной системы обращения с данными классами медицинских отходов, направленной на охрану здоровья населения в целом. Система обращения с медицинскими отходами предполагает разработку системы лабораторного производственного контроля в соответствии с требованиями санитарного и экологического законодательства. и проведение соответствующих натурных исследований.

По результатам натурных исследований представлено обоснование оптимального перечня показателей в составе программы производственного контроля для осуществления контроля воздействия технологий термического обезвреживания на среду обитания и здоровье населения на примере технологии автоклавирования «Балтнер».

Ключевые слова: *медицинские отходы; установка термического обезвреживания; программа производственного контроля; натурные исследования.*

Mironenko O.V., Suvorova O.K.
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg, Russia

Organization and monitoring independent work of students in chemistry using electronic learning tools

The medical institutions need optimization of the special indicators list to control efficiency of decontamination of infected and non-infected biomedical and health-care wastes after thermal treatment. The objective of this investigation was to justify the operating characteristics of thermal biomedical and health-care wastes treatment to decrease the possible negative impact of such technologies on the environment and health.

The technical modes of autoclaving were investigated. The investigations include measurements of noise, vibration, microclimate, air pollution, pollution of waste water, efficiency of decontamination of wastes. The efficiency of decontamination of wastes was investigated by different bacteriological, chemical and toxicological indicators.

Key words: *thermal wastes treatment; the technical modes of autoclaving; air pollution, pollution of waste water; the efficiency control of decontamination of infected and non-infected biomedical and health-care wastes after thermal treatment.*

Проблема обезвреживания/обеззараживания медицинских отходов, образующихся в медицинских организациях, занимает значительное место среди существующих экологических проблем.

В настоящее время вопрос организации системы обращения с медицинскими отходами и внедрение аппаратного метода обеззараживания в учреждениях здравоохранения стал особенно актуальным по причине изменения требований российского законодательства в экологической и санитарной сфере.

Прежде всего, это связано со вступлением в силу с 1 августа Приказа Росприроднадзора от 18.07.2014 № 445 «Об утверждении федерального классификационного каталога отходов», в котором осталась только одна группа, содержащая медицинские отходы, а именно: «Отходы при обезвреживании биологических и медицинских отходов».

Обезвреживание медицинских отходов, как известно, должно обеспечивать два условия, которые классическая химическая дезинфекция отходов не выполняет:

– полную утрату свойств патогенности медицинских отходов посредством аппаратных способов обеззараживания с применением физических методов;

– утрату товарного вида медицинских отходов.

Санитарные правила по обращению с медицинскими отходами выделяют следующие методы аппаратного обеззараживания медицинских отходов: водяным насыщенным паром под избыточным давлением, температурой, радиационным, электромагнитным излучением.

В рамках конференции сторон Базельской конвенцией о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением, прошедшей в Женеве в 2002 году, ООН были приняты «Технические руководящие принципы экологически обоснованного регулирования биомедицинских и медицинских отходов к приоритетным методом обработки отходов были отнесены такие как, стерилизация паром и стерилизация сухим жаром. Несколько отечественных производителей

лей выпускают автоклавы для дезинфекции медицинских отходов, обладающие как высокой, так и низкой производительностью.

Эффективность парового метода стерилизации и дезинфекции является неоспоримым общепринятым фактом.

Основным фактором, влияющим на эффективность паровой дезинфекции/стерилизации объектов, является паропроницаемость упаковочных материалов, поскольку насыщенный водяной пар оказывает свое действие только при непосредственном контакте с дезинфицируемой поверхностью.

В некоторых случаях производитель оборудования рекомендует размещать медицинские отходы, упакованные в обычный полиэтиленовый мешок или в открытый термостойчивый полипропиленовый пакет. В процессе паровой обработки происходит постепенное разрушение полиэтиленового пакета и проникновение пара к медицинским отходам.

Автоклав для обеззараживания медицинских отходов должен обеспечивать эффективное удаление воздуха из всего объема загрузки посредством многократного предварительного вакуумирования, иначе необходимо значительно увеличивать длительность стерилизационного цикла.

Обеззараживание медицинских отходов на установках «БАЛТНЕР» достигается методом автоклавирования с предварительным вакуумированием камеры автоклава в режиме 114-121 град. С, давлением 0,89-1,1 атм, экспозицией – до 1 часа (режим дезинфекции), утратой товарных свойств и внешнего вида – измельчение и /или прессованием.

В ходе термического обезвреживания медицинских отходов за счет контакта медицинских отходов с водяным паром образуются загрязняющие вещества, поступающие в воздух рабочей зоны, которые далее через систему вентиляции поступают в атмосферный воздух. Установки «БАЛТНЕР» также являются источником шумового и теплового воздействия.

Целью данного исследования являлось обоснование перечня показателей, отражающих возможное негативное воздействие такого рода технологий на окружающую среду, рабочую зону и эффективность выполненной дезинфекции отходов от медицинских учреждений.

С целью создания эпидемиологической безопасности в медицинском учреждении и эффективной экологической системы, направленной на охрану здоровья населения в целом, очевидна необходимость применения технологий термического обезвреживания инфицированных и потенциально инфицированных медицинских отходов, когда одну из ключевых позиций занимает адекватная си-

стема лабораторного производственного контроля в соответствии с требованиями санитарного и экологического законодательства.

Для оценки воздействия на среду обитания и здоровье населения технологии обезвреживания медицинских отходов с применением автоклавирования медицинских отходов классов «Б» и «В» (за исключением биологических отходов) насыщенным водяным паром с предварительной вакуумной откачкой воздуха, последующим измельчением и компактированием на установках «БАЛТНЕР» были выполнены замеры следующих показателей:

- определение перечня и концентраций загрязняющих веществ в воздухе рабочей зоны (санитарно-химические показатели);
- уровни шумового воздействия установки;
- концентрации загрязняющих веществ в сточных водах от установки (санитарно-химические показатели);
- данные по эффективности обеззараживания отходов от различных видов медицинских организаций – общесоматические, противотуберкулезные, учреждения родовспоможения по санитарно-бактериологическим показателям, а также выполнена оценка показателей токсичности и установление класса опасности отхода после обезвреживания. Всего – около 300 протоколов исследования.

Кроме того, расчетным методом были определены максимальные приземные концентрации загрязняющих веществ в атмосферном воздухе при рассеивании выбросов от установки.

Были подвергнуты углубленному изучению технологические режимы установок воздействия пара под давлением (автоклавирования) и соответствующие материалы протоколов лабораторного контроля (шум, вибрация, микроклимат на рабочих местах, воздух окружающей среды, рабочей зоны, сточные воды, эффективности обеззараживания по санитарно-бактериологическим показателям).

В результате проведения хромато-масс-спектрометрических исследований в пробах воздуха рабочей зоны, отобранных на рабочем месте оператора по обезвреживанию медицинских отходов; идентифицированы органические соединения, такие как, пропанол (изопропиловый спирт) и бутокси-этанол (бутилгликоль – бутиловый эфир этиленгликоля). В меньших концентрациях представлены: этанол, бутанол, уксусная кислота, а также следы альдегидов (С6-С10), высших спиртов (С13-С16). Уровень загрязнения воздуха рабочей зоны по результатам натуральных замеров соответствует требованиям санитарного законодательства.

На основании проведенных натурных исследований: состава выбросов загрязняющих веществ в воздух рабочей зоны, показателей состава сточных вод; уровней шума; показателей эффективности обеззараживания отходов был определен перечень показателей для формирования программы производственного контроля в части контроля за эффективностью обезвреживания отходов классов Б и В в медицинских организациях.

В соответствии с требованиями санитарного и экологического законодательства необходимо осуществлять микробиологический контроль эффективности дезинфекции по показателям ОМЧ, наличие патогенной микрофлоры, контроль состояния воздуха населенных мест при работающей установке – 50 м от установки, на границе лечебных корпусов/жилой застройки воздух рабочей зоны по показателям – бензол, этилбензол, толуол, ксилол, бутоксиэтанол (бутилглицоль), этанол (этиловый спирт), бутанол (бутиловый спирт), пропанол (изопропиловый спирт), шума и вибрации на рабочих местах (при наличии пресса или измельчителя), организовать контроль состояния сбрасываемых сточных вод от работающих установок по показателям БПК₅ и ХПК, уровнях показателей микробиологического и паразитологического загрязнения (ТТКБ, ОУКБ, колифаги, возбудители сальмонеллы, жизнеспособные яйца гельминтов (аскарид, власоглав, токсокар, фасциол) и жизнеспособных цистах патогенных кишечных простейших) в зависимости от решаемых целей и задач.

Заключение. В соответствии с требованиями санитарного и экологического законодательства необходимо в процессе централизованной и децентрализованной эксплуатации установки термического обезвреживания медицинских отходов классов Б и В реализовывать программу производственного контроля, включающую показатели:

- микробиологический контроль эффективности дезинфекции по показателям ОМЧ, наличие патогенной микрофлоры,
- контроль состояния воздуха населенных мест при работающей установке – 50 м от установки, на границе лечебных корпусов/жилой застройки; воздуха рабочей зоны по показателям – бензол, этилбензол, толуол, ксилол, бутоксиэтанол (бутилглицоль), этанол (этиловый спирт), бутанол (бутиловый спирт), пропанол (изопропиловый спирт),
- контроль шума и вибрации на рабочих местах (при наличии пресса или измельчителя),
- уровень загрязнения сбрасываемых сточных вод от работающих установок по показателям БПК₅ и ХПК, показатели микро-

биологического и паразитологического загрязнения (ТТКБ, ОУКБ, колифаги, возбудители сальмонеллы, жизнеспособные яйца гельминтов (аскарид, власоглав, токсокар, фасциол) и жизнеспособные цисты патогенных кишечных простейших.

Согласно действующему российскому законодательству на любом участке (централизованном или децентрализованном) термического обезвреживания/обеззараживания отходов классов Б и В необходимо осуществлять постоянное мониторинговое наблюдение основных показателей, доказывающих отсутствие негативного воздействия на окружающую среду, в том числе при получении официальных документов, разрешающих применение такого рода новых технологий.

Список литературы

1. Русаков Н.В., Щербо А.П., Мироненко О.В. Обращение с медицинскими отходами: идеология, гигиена и экология. Экология человека. Архангельск. 2018. № 7. С. 4-10, 2 с.

2. Мироненко О.В., Бормашов А.В., Балакаева А.В., Сопрун Л.А. Гигиеническое обоснование выбора технологии обезвреживания отходов в зависимости от вида специализированной медицинской помощи. Дезинфекция. Антисептика. М. 2012. Т.3., 2 с.

3. Щербо А.П., Мироненко О.В. Проблемы обращения с медицинскими отходами. Биосфера.Т.5. №4. СПб, 2013, 3с.

4. Щербо А.П., Мироненко О.В., Суший К.К., Козырин К.И., Сопрун Л.А., Эколого-гигиенические предпосылки и инженерные подходы к управлению медицинскими отходами. Архангельск. Экология человека. 2013. № 6, 4 с.

5. Протокол № 18915 исследования воздуха рабочей зоны помещений от 25.08.2019, выполненного лабораторного испытательного центра ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» (Б-30). Экспертное заключение ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» №78-20-09.009.Л.23576 от 04.10.2019.

6. Протокол № 1786П-19 исследования воздуха рабочей зоны помещений от 19.11.2019, выполненного испытательной лабораторией «Центра экологических исследований и мониторинга» (Б-50). Протокол №1798П-19 исследования воздуха рабочей зоны помещений от 19.11.2019, выполненного лабораторного испытательной лабораторией «Центра экологических исследований и мониторинга» (Б-15).

7. Протокол № 26506.19-1 26506 -1 от 5 июня 2019 года ООО «ТА-СИС» определения токсикологического и количественного состава отходов обезвреживания медицинских отходов классов Б и В (кроме

биологических) вакуумным автоклавированием насыщенным водяным паром измельченные, компактированные, практически неопасные (АКТ отбора проб отходов №26506 .19 -1 « 25 » 2019).

8. Расчет количества выбросов загрязняющих веществ при работе установок «БАЛТНЕР 15» и «Балтнер-Ш 15». Расчет рассеивания загрязняющих веществ в атмосферном воздухе с учетом застройки по МРР-2017 при работе установок «БАЛТНЕР 15» и «БАЛТНЕР-Ш 15». Карты-схемы распространения загрязняющих веществ при работе установок «БАЛТНЕР 15» и «Балтнер-Ш 15».

9. Протокол № 26506.19-1 26506 -1 от 5 июня 2019 года ООО «ТАСИС» определения токсикологического и количественного состава отходов обезвреживания медицинских отходов классов Б и В (кроме биологических) вакуумным автоклавированием насыщенным водяным паром измельченные, компактированные, практически неопасные (АКТ отбора проб отходов №26506 .19 -1 « 25 » 2019).

10. Расчет количества выбросов загрязняющих веществ при работе установок «БАЛТНЕР». Расчет рассеивания загрязняющих веществ в атмосферном воздухе с учетом застройки по МРР-2017 при работе установок «БАЛТНЕР».

УДК 616.89-008.444.4:376/]-053/2

*Митюкова Т.А.¹, Докукина Т.В.², Полулях О.Е.³
ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»¹, Минск
РНПЦ психического здоровья МЗ РБ², Минск
ГНУ «Институт физиологии» НАН³ Беларуси, Минск
mitykovat@gmail.com¹, polak0208@mail.ru², reanzy@yandex.ru³*

Нейротрофические и нейроиммунные показатели при оценке эффективности транскраниальной магнитной стимуляции у детей с аутизмом

Проведено изучение нейротрофических, медиаторных и нейроиммунных показателей в сыворотке крови детей с аутизмом на фоне лечения методом транскраниальной магнитной стимуляцией (ТМС). Показано, что ТМС оказывает положительный клинический эффект, при этом уровни BDNF и програнулина не изменяются, а повышенные значения глутамата и антител к основному белку миелина снижаются до нормальных значений.

Ключевые слова: аутизм, транскраниальная магнитная стимуляция, BDNF, програнулин, глутамат, антитела к основному белку миелина.

Mityukova T.A.¹, Dokukina T.V.², Poluliakh O.E.³
Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus¹,
Minsk, Republic of Belarus;
Republican Research and Practice Mental Health Center², Minsk,
Republic of Belarus;
Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus³,
Minsk, Republic of Belarus

Neurotrophic and neuroimmune values in assessing the effectiveness of transcranial magnetic stimulation in children with autism

The study of neurotrophic, mediator and neuroimmune serum parameters in children with autism during treatment with transcranial magnetic stimulation (TMS) was carried out. It has been shown that TMS has a positive clinical effect, herewith the levels of BDNF and progranulin do not change, while the increased values of glutamate and antibodies to myelin basic protein decrease to normal values.

Key words: *autism, transcranial magnetic stimulation, BDNF, progranulin, glutamate, antibodies to myelin basic protein.*

Детский аутизм относится к расстройствам психологического развития (рубрика F84 по МКБ-10) и формируется в раннем возрасте. Он проявляется нарушениями, связанными с социальным взаимодействием, вербальной и невербальной коммуникацией. Для детей с аутизмом характерно погружение в себя, стереотипное поведение, снижение интеллектуального уровня и узкий круг интересов [1, 2]. У них часто присутствуют патологические изменения в различных системах и органах, включая иммунную систему. Предполагается, что дисбаланс в иммунной системе может приводить к хроническому неспецифическому воспалению в организме и аутоиммунным процессам, что может отражаться на состоянии центральной нервной системы [3-6]. Основной белок миелина (ОБМ) является одним из ключевых белков ЦНС, обеспечивающим защиту и формирование структуры нервных волокон, проведение нервного импульса по аксонам. Антитела к основному белку миелина (АТ-ОБМ) появляются на фоне активации аутоиммунных процессов, причем, они могут играть деструктивную роль [7].

Наряду с этим большой интерес представляет изучение нейротрофических белков, в частности мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и програнулина, которые обеспечивают выживание и дифференцировку нейронов, что крайне важно для формирования мозга в процессе развития ребенка [8]. Програнулин в нервной ткани играет не только нейротрофическую роль, но также подавляет воспали-

тельные процессы и ускоряет регенерацию после повреждающих воздействий [9]. Глутамат является главным возбуждающим медиатором ЦНС, играющим важную роль в ранней пренатальной жизни, в синаптогенезе, пластичности нейронов и в поддержании когнитивных функций [10]. Одна из гипотез патогенеза аутизма рассматривает глутаматную эксайтотоксичность, как основную причину повреждения мозга при аутизме [11].

Известно, что аутизм плохо поддается лечению и коррекции, лекарственные средства часто вызывают нежелательные побочные эффекты, поэтому проводится поиск инструментальных методов лечения, не оказывающих побочного воздействия. В настоящее время транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС) стала применяться с лечебной целью, как во взрослой, так и в детской психиатрии. На базе РНПЦ психического здоровья (Минск) используется протокол ритмической ТМС (рТМС), заключающийся в подаче серий импульсов магнитного поля определенной частоты с заданной длительностью серии и интервалами между сериями. Продолжительная модуляция корковой возбудимости, активация специфических нейронных цепей и нейропластичности дает возможность использовать рТМС в терапевтических целях при аутизме. Согласно одной из теорий патогенеза аутизма именно нарушение нейропластичности и созревания синапсов приводит к дисбалансу процессов возбуждения и торможения в головном мозге, с преобладанием непропорционально высокого уровня возбуждения.

Цель работы – изучить динамику уровней нейротрофических белков – BDNF и програнулина, медиатора глутамата и содержания антител к основному белку миелина (АТ-ОБМ) в сыворотке крови детей с аутизмом на фоне лечения методом транскраниальной магнитной стимуляции (ТМС).

Материалы и методы. Диагностика аутизма проводилась согласно критериям МКБ-10. Также использовалась детская рейтинговая шкала оценки аутизма (CARS) и дополнительно к этому оценивали в баллах ряд симптомов и признаков, характерных для детей с нарушениями психоречевого развития.

Обследована группа детей с аутизмом (F84.0), у которых отсутствовали положительные эффекты при занятиях с психологом и использовании ноотропных и нейропротекторных препаратов. Группа состояла из 15 человек: 13 мальчиков и 2 девочки, возраст 4-7 лет. Каждый ребенок получил курсовое лечение методом рТМС, состоящее из 19-20 процедур. Клинико-психологическое обследование и забор крови для определения лабораторных показателей проводили до и после лечения (1-2 месяца после лечения).

Определение нейротрофических и нейроиммунных показателей в сыворотке крови проводили ИФА-методом с использованием коммерческих наборов: АТ-ОБМ, Cusabio (Китай); BDNF, DRG (Германия); програнулин, Cloud Clone Corp. (Китай). Уровень глутамата в сыворотке крови определяли с использованием биохимических наборов Sigma Aldrich (США). Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами непараметрической статистики с использованием программного обеспечения Statistica 7.0, результаты представлены в виде медиан и процентилей (Me [25;75]). Достоверными считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Обследованные дети характеризовались выраженными нарушениями вербальной и невербальной коммуникации. Дети практически не вступали в контакт, отличались, как правило, неупорядоченным гиперактивным поведением и слабо развитой речью, не отзывались на имя, не понимали обращенную к ним речь, навыки самообслуживания были развиты частично. После курсового лечения методом ТМС пациенты, как правило, становились более усидчивыми и спокойными, упорядочивалось поведение, нормализовалась речь, появлялись новые слова.

Данные по изучению вышеперечисленных лабораторных показателей представлены в таблице 1. Содержание BDNF и програнулина у детей с аутизмом колебалось, в основном в пределах нормы. Проведенное лечение практически не влияло на содержание этих показателей в сыворотке крови.

Следует отметить, что в группе «до лечения» было зарегистрировано 42% повышенных за пределы нормы значений глутамата, тогда, как после лечения разброс значений показателя практически приблизился к норме. Средний уровень глутамата после лечения достоверно снизился после проведенного лечения. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что глутаматная эксайтотоксичность играет важную роль в патогенезе аутизма. Возможно, влияние ТМС выражается именно в регуляции баланса между возбуждением и торможением за счет снижения уровня возбуждающего медиатора.

Обращает на себя внимание резко повышенный средний уровень АТ-ОБМ, характерный для группы детей с аутизмом. Число детей с выходящими за пределы нормы показателями АТ-ОБМ составляло 40%. После проведенного лечения наблюдалось существенное снижение среднего уровня АТ-ОБМ, однако, не достигающее статистической значимости из-за высокой вариабельности данного параметра. Индивидуальные значения показателя снижались у всех пациентов, даже у тех, у кого они находились в пределах нормы. Можно приве-

сти ряд примеров, характеризующих хороший клинический эффект: пациентка О. — АТ-ОБМ 800 нг/мл (до лечения), 503 нг/мл (после лечения); пациент П. — 619 нг/мл (до лечения), 346 нг/мл (после лечения); пациент Д. — 570 нг/мл (до лечения), 333 нг/мл (после лечения).

Таблица 1. Лабораторные показатели у детей с аутизмом до и после лечения методом ТМС

Показатели	Норма (здоровые дети)	Аутизм, до лечения ТМС	Аутизм, после лечения ТМС
BDNF, нг/мл	11-23	16,1 [13,5; 22,4]	19,5 [15,9; 29,1]
Програнулин, нг/мл	38-68	52 [48; 60]	46 [36; 50]
Глутамат, нг/мкл	41-96	93 [81; 110,3]	55,9 [52,9; 75]*
АТ-ОБМ, нг/мл	96-273	185,5 [95,5; 594,5]	73 [39; 346]

Примечание: * — достоверные отличия между группами до и после лечения, $p < 0,05$.

Заключение. Проведенные исследования демонстрируют позитивный клинический эффект ТМС в плане коррекции вербальной и невербальной коммуникации у детей с аутизмом.

Показано, что на фоне проводимого лечения достигается снижение изначально повышенного среднего уровня глутамата у детей с аутизмом, что, по-видимому, свидетельствует о восстановлении нарушенного баланса между возбуждением и торможением в ЦНС. Положительный клинический результат лечения методом ТМС, как правило, сопровождается снижением повышенных значений АТ-ОБМ у детей с аутизмом.

Список литературы

1. Wing, L. Childhood autism and social class: a question of selection? / L. Wing // *British Journal of Psychiatry*. 1980. Vol. 137. P. 410-417.
2. Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем. Десятый пересмотр (МКБ-10). ВОЗ, Швейцария, Женева. Русский перевод. М., Медицина. 1998. Т.1, ч.1 — 698 с., Т.1, ч.2 — 633 с., Т.2 — 179 с., Т.3 — 429 с.

3. Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorders: Role of High Mobility Group Box 1 Protein /V. Dipasquale [et al.] // Int.J. Mol.Cell. Med. 2017.- Vol. 6.- P. 148-155.
4. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder / G. Bjorklund [et al.] // Acta Neurobiol. Exp. (Wars). 2016. Vol. 76. P. 257-268.
5. Immune related factors in pathogenesis of autism spectrum disorders /P. Szachta [et al.] // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2016. Vol. 20. P. 3060-3072.
6. Prenatal infection leads to ASD-like behavior and altered synaptic pruning in the mouse offspring / L. F. de Cossno [et al.] // Brain Behav. Immun. 2017. Vol. 63. P. 88-98.
7. Основной белок миелина. Строение, свойства, функции, роль в диагностике демиелинизирующих заболеваний / В. П.Чехонин [и др.] // Вопросы медицинской химии. 2000. №6. С. 549-563.
8. Meta-Analysis of BDNF Levels in Autism / R. Armeanu [et al.] // Cell Mol Neurobiol DOI 10.1007/s10571-016-0415-7.
9. He, Z. Progranulin (granulin-epithelinprecursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis / Z. He, A. Bateman // J. Mol. Med. 2003. Vol. 81. P. 600-612.
10. Sheldon A. L. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention / A. L. Sheldon, M.B. Robinson // Neurochem. Int. 2007. Vol. 51. P. 333–355.
11. Fatemi S. H. The hyperglutamatergic hypothesis of autism / S. H. Fatemi // Prog.Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2008. Vol. 32. P. 911–913.

УДК 616.8-009.11-616-074

*Налькин С.А., Соколова М.Г., Лобзин С.В., Кокоренко В.Л.,
Васильева Н.В., Фролова Е.В., Аак О.В.
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург
nerv-spb@ya.ru*

**Новые возможности применения диагностического критерия –
концентрации антител к ацетилхолиновым рецепторам при миастении**

Проведенное клинико-лабораторное исследование 30 пациентов миастенией выявило: у больных генерализованной формой достоверную положительную связь между концентрацией антител к ацетилхолиновым

рецепторам (АХР) и уровнем ситуативной ($r=0,37, p<0,01$) и личностной ($r=0,37, p<0,01$) тревоги; у больных с глазной формой миастении при увеличении концентрации антител к АХР наблюдалось снижение суммарного количества баллов по шкалам ММСЕ ($r=-0,38; p<0,01$) и FAB ($r=-0,62; p<0,01$). Полученные данные позволяют рассматривать концентрацию антител к АХР как прогностический критерий развития нейропсихологических расстройств у больных миастенией.

Ключевые слова: миастения, антитела к ацетилхолиновым рецепторам, прогностический критерий, нейропсихологическая сфера.

*Nalkin S.A., Sokolova M.G., Lobzin S.V., Kokorenko V.L.,
Vasileva N.V., Frolova E.V., Aak O.B.
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
Saint Petersburg*

New possibilities of using the diagnostic criterion – the concentration of antibodies to acetylcholine receptors in myasthenia gravis

The conducted clinical and laboratory study of 30 patients with myasthenia gravis revealed: in patients with the generalized form there is a reliable positive relationship between the concentration of antibodies to acetylcholine receptors (AChR) and the level of situational ($r=0.37, p<0,01$) and personal ($r=0.37, p<0,01$) anxiety; in patients with ocular myasthenia gravis, with an increase in the concentration of antibodies to AChR, a decrease in the number of points on the MMSE ($r=-0.38; p<0,01$) and FAB ($r=-0.62; p<0,01$) scales was observed. The obtained data allow considering the concentration of antibodies to AChR as a prognostic criterion for the development of neuropsychological disorders in patients with myasthenia gravis.

Key words: myasthenia gravis, antibodies to acetylcholine receptors, prognostic criterion, neuropsychological sphere.

Миастения — хроническое аутоиммунное заболевание, развивающееся в результате выработки антител к различным антигенным мишеням нервно-мышечного синапса, характеризующееся быстрой утомляемостью и слабостью скелетных мышц [1]. Ацетилхолиновый рецептор — основная мишень аутоиммунных реакций при миастении. Антитела к ацетилхолиновому рецептору реагируют с альфа-субъединицей рецептора и способны снижать количество молекул активного рецептора на постсинаптической мембране (концевой пластинке), вызывая его интернализацию и ускорение клиренса [2].

Антитела к ацетилхолиновому рецептору отмечаются у 80-90% больных с генерализованной миастенией, 80-90% больных с паранеопластической (тимома-ассоциированной) миастенией, 50% больных с окулярной формой миастении [3]. Мониторинг титров у конкретного пациента может отражать динамику клинического течения заболевания [4]. По-нашему мнению, этот показатель может быть более широко использован. Ранее нами были выявлены изменения в нейропсихологической сфере у больных миастенией [5]. Мы предполагаем, что исследование концентрации антител к ацетилхолиновым рецепторам может отражать не только активность аутоиммунного процесса, но и изменения нейропсихологического состояния больных миастенией.

Цель исследования. Сопоставить концентрации антител к ацетилхолиновым рецепторам с клиническими формами миастении, особенностями течения заболевания и состоянием нейропсихологической сферы больных миастенией для изучения возможности более широкого использования данного диагностического критерия.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 30 больных миастенией в возрасте $47,5 \pm 14,8$ лет (9 мужчин и 21 женщина), которые проходили стационарное лечение в неврологическом отделении больницы им. Петра Великого ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Контрольная группа составила 21 человек (4 мужчин и 17 женщин) в возрасте $46,9 \pm 11,1$ лет (4 мужчин и 17 женщин) прошедших комплексное обследование в рамках диспансеризации. Больным миастенией проводилось нейропсихологическое тестирование: краткая шкала оценки психического статуса (MMSE), тест рисования часов, методика заучивания 10 слов по А.Р. Лурия, методика «таблицы Шульце», определение уровня личностной и ситуативной тревожности осуществлялось при помощи шкалы тревоги Ч.Д. Спилбергера (в адаптации Ю.Л. Ханина). Исследование концентрации антител к ацетилхолиновым рецепторам выполнялось при помощи иммуноферментных наборов Medizym anti-AChR согласно инструкции фирмы «Medipan GmbH» в сыворотке крови пациентов. При титре антител к АХР более 0,5 нмоль/л тест оценивался как положительный.

Результаты и их обсуждение. По данным проведенного обследования у 18 (60,0%) больных была диагностирована генерализованная форма миастении, из них у 3 больных (16,7%) выявлена тяжелая форма заболевания, у 10 (83,3%) – средней степени тяжести. Глазная форма миастении встречалась в 12 (40,0%) случаях. Тимома, по данным магнитно-резонансной или компьютерной томографии органов переднего средостения, выявлена у 9 (30,0%) больных, среди них тиреоидэктомия на момент обследования выполнена в 6 (66,7 %) случаях.

Согласно результатам иммуноферментного анализа концентрация антител к АХР в сыворотке крови у пациентов генерализованной формой миастении составила $16,37 \pm 9,53$ нмоль/л, у лиц с глазной формой заболевания — $6,13 \pm 9,23$ нмоль/л. В группе контроля антитела к АХР в сыворотки крови не выявлялись. В ходе исследования было установлено, что у пациентов с генерализованной формой миастении, перенесших тимэктомию, наблюдались более низкие концентрации антител к АХР ($6,82 \pm 2,24$ нмоль/л) в сравнении с большими не получавших хирургического лечения ($18,57 \pm 0,34$ нмоль/л) ($p < 0,01$). Выявлена положительная корреляционная связь между концентрацией антител к АХР у больных генерализованной формой миастении и продолжительностью заболевания ($r = 0,39$; $p < 0,01$). При сопоставлении результатов нейропсихологического тестирования установлено, что у пациентов с глазной формой миастении увеличение концентрации антител к АХР вызывает снижение количества баллов по шкале FAV ($r = -0,62$, $p < 0,01$) и увеличивает длительность работы над каждой таблицей пробы Шульце ($r = 0,51$, $p < 0,01$). В ходе проведенного исследования обнаружено, что у больных с глазной формой миастении с увеличением концентрации антител к АХР наблюдалось снижение суммарного количества баллов по шкалам MMSE ($r = -0,38$; $p < 0,01$) и FAV ($r = -0,62$; $p < 0,01$). У больных генерализованной формой миастении выявлена достоверная положительная связь между уровнем антител к АХР и выраженностью ситуативной ($r = 0,37$, $p < 0,01$) и личностной ($r = 0,37$, $p < 0,01$) тревоги.

Выводы. Таким образом, можно отметить, что полученные данные позволяют рассматривать концентрацию антител к АХР не только как диагностический, но и как прогностический критерий развития нейропсихологических расстройств у больных миастенией.

Список литературы

1. Romi F., Hong Y., Gilhus N. E. Pathophysiology and immunological profile of myasthenia gravis and its subgroups // Current opinion in immunology. 2017. Vol. 49. P. 9-13.
2. Санадзе А.Г. Миастения и миастенические синдромы / А.Г. Санадзе — 2-е изд., испр. М.: ГЭОТАР-медиа, 2017. 256 с.
3. Агафонов Б.В. Миастения и врожденные миастенические синдромы / Б.В. Агафонов, О.П. Сидорова, С.В. Котов М. М.: МИА, 2013 — 244 с.
4. Гасымлы Э.Д. Иммунопатогенез миастении гравис (обзор литературы) // Архив внутренней медицины. 2018. Т. 8. №. 3 (41).
5. Налькин С.А., Лобзин С.В., Соколова М.Г. Особенности когнитивных функций у пациентов с миастенией // Медицинский академический журнал. 2018. —Т. 18.- №3. С. 41-45.

*Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В.
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
Санкт-Петербург
shenna1@yandex.ru*

**Оккультная форма хронического вирусного гепатита В,
способы выявления у доноров крови**

Для оценки вероятности передачи ВГВ посредством переливания крови важно определять распространенность оккультного гепатита В среди здоровых доноров крови. Проведена оценка серологических и молекулярно-биологических методов при выявлении оккультного ХВГВ у доноров крови. Выявление ВГВ низкой вирусной нагрузки – необходимый шаг в алгоритме лабораторной диагностики ВГВ у доноров крови.

***Ключевые слова:** ВГВ, ХВГВ, оккультный гепатит В, доноры крови, инфекционная безопасность.*

*Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V.
Saint Petersburg Pasteur Institute
Saint Petersburg*

Chronic viral hepatitis B occult form, detection methods in blood donors

To assess the HBV transmission likelihood through blood transfusion, it is important to determine the occult hepatitis B prevalence among healthy blood donors. Serological and molecular biological methods evaluation for the occult CHB detection in blood donors was carried out. HBV low viral load detection is a necessary step in the algorithm for HBV laboratory diagnosis in blood donors.

***Key words:** HBV, CHB, occult hepatitis B, blood donors, infectious safety.*

Обеспечение инфекционной безопасности гемотрансфузий при проведении плановых и экстренных хирургических операций является актуальной медицинской проблемой и должно осуществляться в первую очередь с целью предупреждения передачи вирусов. Риск инфицирования вирусом гепатита В (ВГВ) после трансфузии выше, чем у других передаваемых через кровь вирусов, таких как ВИЧ и ВГС [1]. Посттрансфузионная инфекция ВГВ представляет собой серьезную проблему и является одним из значимых факторов риска инфицирования людей. Критерии и протокол, принятые при серологическом скрининге доноров крови, значительно снизили вероятность передачи ВГВ. Тем не менее, в поздней фазе инфекции ВГВ серонегативные доноры могут пере-

давать вирус, несмотря на внедрение универсальной вакцинации и разработку чувствительных и специфических анализов, которые в последние десятилетия снизили риск заражения [2]. Одной из форм естественного течения хронического вирусного гепатита В (ХВГВ) является оккультный гепатит В (окГВ), характеризующийся отсутствием HBsAg и крайне низким уровнем ДНК ВГВ в сыворотке крови (<200 МЕ ДНК ВГВ/мл) вплоть до невозможности обнаружения стандартными методами при определяющей ДНК вируса в тканях печени [3]. Проблема оккультного ГВ стала особенно актуальной в связи с новыми возможностями трансплантологии и данными о высоком риске инфицирования при переливании крови/компонентов крови с ВГВ даже при крайне низкой вирусной нагрузке, согласно которым минимальная инфекционная доза составляет 16 копий (3 МЕ/мл) ДНК ВГВ [4]. В том числе в связи с тем, что окГВ может обнаруживаться у лиц отрицательных по всем маркерам ВГВ при использовании стандартных коммерческих наборов [5].

Значимость выявления окГВ у доноров крови была показана при исследовании специфического иммунного ответа, где выраженность Th1 ответа у лиц с оккультным ГВ была значительно выше, чем у пациентов с ХВГВ в фазе неактивного носительства ВГВ [6, 7]. Несмотря на отсутствие в периферической крови HBsAg, большинство пациентов с окГВ являются серопозитивными по одному или нескольким серологическим маркерам в зависимости от фазы течения заболевания, однако более 20% больных серонегативны по всем маркерам ВГВ [8]. Определение ДНК ВГВ в ткани печени остается «Золотым стандартом» и практически единственным достоверным методом лабораторной диагностики окГВ [3]. Однако в связи с тем, что данная методика требует инвазивного вмешательства, использовать ее для скрининга доноров крови не представляется возможным. Тем не менее, чрезвычайно важно определять распространенность окГВ среди здоровых доноров крови для оценки вероятности передачи ВГВ посредством переливания крови, а затем оценить необходимость улучшения и даже изменения стратегий предварительного отбора доноров для снижения риска передачи [9].

Диагностику ВГВ можно условно разделить на две группы специфических маркеров: прямое обнаружение возбудителя (выявление антигенов и ДНК ВГВ) и косвенное (определение антител), а по методу выявления вируса на серологические и молекулярно-биологические. При этом значимость и информативность этих методов и маркеров различна.

Целью нашей работы было оценить серологические и молекулярно-биологические методы при выявлении оккультного хронического вирусного гепатита В у доноров крови.

Материалы и методы. Материалом служили 832 образца плазмы крови от доноров, проживающих в г. Челябинск. Образцы исследовали на наличие HBsAg, антител анти-HBcore IgG, анти-HBs IgG, анти-HBe IgG (тест-системы ЗАО «Вектор-Бест», НПО «Диагностические системы»), согласно инструкциям производителя. Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя. Выявление ДНК ВГВ проводили с помощью коммерческих наборов «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), «HBV RG PCR Kit» (Qiagen), а также с использованием разработанных во ФБУН НИИ ЭМ имени Пастера способов выявления ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР с визуализацией результатов после электрофореза в агарозном геле на УФ трансиллюминаторе и с детекцией в режиме реального времени [10].

Результаты и обсуждение. Возраст доноров крови в группе варьировал от 18 лет до 61 года и в среднем составил $33,5 \pm 8,7$ лет. Количество мужчин в обследуемой группе преобладало по сравнению с женщинами – 66,82% и 33,18%, соответственно. При анализе на серологические маркеры в обследованной группе не выявили и одного человека с HBsAg. Антитела HBcore IgG обнаружили в 8,53% случаев. ДНК ВГВ удалось выявить у 4,2% обследуемых доноров. Отметим, что среди 8,53% случаев обнаруженных анти-HBcore IgG ДНК ВГВ была выявлена только у 11,6%, то есть анти-HBcore IgG остается суррогатным гипердиагностическим маркером окГВ. Это согласуется с данными о том, его обнаружение не является абсолютным доказательством наличия заболевания в связи с высоким уровнем (до 85%) ложноположительных результатов, как было показано ранее [11]. У пациентов с выявленной ДНК ВГВ антитела HBcore IgG были обнаружены только в 22,7% случаев. Таким образом, хотя анализ на HBcore IgG позволил бы выявить несколько HBsAg-негативных доноров крови с окГВ, более чем 77,3% доноров крови с ВГВ не могли быть обнаружены с помощью данного маркера.

Отметим, что ДНК ВГВ удалось выявить при использовании коммерческого набора «HBV RG PCR Kit» (Qiagen), а также с использованием разработанных во ФБУН НИИ ЭМ имени Пастера

способов выявления ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР как с визуализацией результатов после электрофореза в агарозном геле на УФ трансиллюминаторе, так и с детекцией в режиме реального времени. Наибольшую чувствительность при экстракции из 100 мкл плазмы крови показал метод, для которого необходимо проведение серии манипуляций пост-nested-ПЦР: заливка агарозного геля, электрофорез в агарозном геле, визуализация на УФ трансиллюминаторе. Разработанный нами метод с детекцией в режиме реального времени менее чувствителен и сопоставим с коммерческим набором «HBV RG PCR Kit» (Qiagen), однако его применение не требует дополнительных действий после nested-ПЦР и может быть использовано в рутинной лабораторной практике для выявления ДНК ВГВ у доноров крови.

Заключение. Выявление серологических маркеров не позволяет определить оккультный ВГВ у доноров крови во всех случаях. Применение молекулярно-биологических методов, позволяющих выявлять ВГВ при низкой вирусной нагрузке, представляется необходимым шагом в алгоритме лабораторной диагностики оккультного хронического вирусного гепатита В у доноров крови.

Список литературы

1. Jeantet D., Chemin I., Mandrand B., et al. Cloning and expression of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays // *J Med Virol.* 2004.73. p.508–515.
2. Pourkarim M.R., Lemey P., Amini-Bavil-Olyae S., et al. Molecular characterization of hepatitis B virus strains circulating in Belgian patients co-infected with HIV and HBV: Overt and occult infection // *J Med Virol.* 2011. 83. P.1876–1884.
3. Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., et. al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection // *J. Hepatol.* 2008. 49. P.652–657.
4. Candotti D., Assenato S.M., Laperche S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose // *Gut.* 2019. 68(2). p.313-321.
5. De Mitri M.S., Cassini R., Bernardi M. Hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis: molecular oncogenic potential of clear or occult infections // *Eur J Cancer.* 2010. 46. p. 2178–2186.

6. Bes M., Vargas V., Piron M., et al. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection // J Hepatol. 2012. 56(4). p. 765-74.

7. Zerbini A., Pilli M., Boni C., et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection // Gastroenterology. 2008. 134. p. 1470–1481.

8. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B // Lancet Infect. Dis. 2002. vol. 2. P. 479–486.

9. Dufour D.R. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) assays-are they good enough for their current uses? // Clin Chem. 2006. 52(8). p. 1457-9.

10. Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. 64 (10). С. 635-640.

11. Candotti D., Allain J. P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection // J. Hepatol. 2009. 51. p. 798–809.

УДК 004.032.26

*Плехова Н.Г.¹, Невзорова В.А.², Черненко И.Н.³,
Присеко Л.Г.⁴, Степанюгина А.К.⁵*

*Центральная научно-исследовательская лаборатория
Тихоокеанского государственного
медицинского университета¹,
Владивосток, Россия*

*Институт терапии и инструментальной диагностики
Тихоокеанского государственного медицинского университета^{2,4},
Владивосток, Россия*

*Тихоокеанский государственный медицинский университет,
Владивосток^{3,5}, Россия*

pl_nat@hotmail.com¹, chernencrj2010@mail.ru³, stepanyugina@gmail.com⁵

Прогнозирование исходов и рисков сердечно-сосудистых заболеваний с применением машинного обучения

Разработан метод прогнозирования риска развития артериальной гипертензии с применением технологий машинного обучения. Созданная нейронная сеть обладала точностью предсказаний до 97,9%, что считается превосходным показателем при применении методов машинного обучения.

***Ключевые слова:** нейронная сеть, Python, Keras, артериальная гипертензия.*

*Plekhova N.G.¹, Nevzorova V.A.², Chernenko I.N.³,
Priseko L.G.⁴, Stepanyugina A.K.⁵
Central research laboratory of the Pacific state medical University¹,
Vladivostok, Russia;
Institute of therapy and instrumental diagnostics
Pacific state medical University^{2,4},
Vladivostok, Russia
Pacific state medical University^{3,5},
Vladivostok, Russia*

Predicting the outcomes and risks of cardiovascular diseases at using machine learning

Summary. A method for predicting the risk of developing hypertension using machine learning technologies has been developed. The created neural network had a prediction accuracy of up to 97.9%, which is considered an excellent indicator when using machine learning methods.

***Key words:** neural network, Python, Keras, arterial hypertension.*

Заболевания сердечно-сосудистой системы (ССЗ) являются наиболее распространенной причиной смертности населения РФ. На данный момент факторами риска развития сердечно-сосудистые заболевания относят более 30 показателей, в том числе и артериальную гипертензию (АГ). Но, в наши дни диагноз АГ ставится лишь при наличии стойко выраженной клинической симптоматики. Такое промедление с постановкой диагноза и началом лечения приводит к формированию стойких изменений в сердечно-сосудистой системе, лежащих в основе патогенеза более серьёзных патологий, например инфаркта миокарда. Таким образом, решение проблемы ранней диагностики АГ, формирование средств для её прогнозирования, позволяет снизить риск развития ССЗ, цереброваскулярных и почечных заболеваний, составляющих 55% в структуре смертности населения Российской Федерации.

На сегодняшний день компьютерные системы активно применяются для решения различных медицинских задач, в том числе позволяют достоверно оценивать риск развития различных заболеваний. Данные системы, основанные на принципах машинного обучения (МО), способны выявить новые предикторы различных заболеваний и оценить их значимость для диагностики заболевания. В исследованиях [1] продемонстрировано, что по сравнению с зарекомендовавшими себя шкалами SCORE, Framingham и DECODE методы машинного обучения точнее предсказывают риск развития ССЗ.

Наша работа ориентирована на создание нейронной сети для оценки риска развития артериальной гипертензии, а в дальнейшем и других сердечно-сосудистых заболеваний. Применение данного метода в перспективе позволит снизить заболеваемость ССЗ за счет ранней диагностики и своевременно начатого лечения.

Нейронная сеть создавалась на основе данных популяционного исследования, проведенного на репрезентативной выборке населения г. Владивостока в рамках многоцентровой наблюдательной Российской программы «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний (ESSE-RF)» в Приморском крае по выявлению распространенности и частоты неинфекционных заболеваний и сопутствующих им факторам риска. В исследовании приняли участие 2000 человек, возраст составил от 25 до 64 лет.

Из полученных данных при помощи «шкалы бинарных переменных для прогнозирования риска развития артериальной гипертензии» [2] были получены значимые переменные, вносящие вклад в развитие заболевания, такие как ИМТ, вес, обхват талии, обхват бедер, возраст, пол, среднее ЧСС, триглицериды, аполипопротеин – А, аполипопротеин – Б, липопротеин (а), тиреторопный горон, инсулин, D-димер, глюкоза, холестерин, липопротеиды низкой плотности, липопротеины высокой плотности, мочевиная кислота, креатинин, С-реактивный белок, фибриноген, натрийуретический пептид.

Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Stata 11.2 и R 3.2.1 (StataCorp LP, США). Для сравнения переменных использовался критерий χ^2 . Для оценки влияния различных переменных на риск развития АГ использовались одно- и многофакторные регрессионные модели пропорциональных рисков Кокса. Статистически значимым считалось значение $p < 0,05$.

Из полученных данных случайным образом формировались 2 выборки: обучающая (включала данные 280 человек) и тестовая (данные 187 человек). Нейронная сеть строилась с применением языка программирования Python, на основе алгоритмов библиотеке Keras. Полученная нейронная сеть строилась на основе модели многослойного персептрона по Румельхарту, реализующей в качестве механизма для обучения – метод обратного распространения ошибки. На основании данного персептрона основана модель Sequential, представляющая набор слоев разной плотности, лежащих в структуре персептрона. Именно с применением данной модели и механизма обучения и оптимизации Adam – adaptive moment estimation (адаптивная оценка момента) была построена представленная нейронная сеть.[3]

Так как исследуемая модель нейросети построена на основе многослойного персептрона, то она включает в себя следующие слои: входной, скрытый, выходной. Входной слой состоит из нейронов, принимающих входные данные, число нейронов соответствует числу предикторов. Входные нейроны связаны с нейронами скрытого слоя, где происходит перемножение матриц весовых коэффициентов, определяющих силу связи между нейронами, и матриц входных данных. После прохождения скрытого слоя данные выводятся на выходные нейроны, представляющие искомые значения. Полученная нейронная сеть представляет собой многослойный персептрон с плотным построением слоев и включает в себя входной слой из 24 нейронов, 3 скрытых слоя и выходной слой с 1 нейроном (рис. 1).

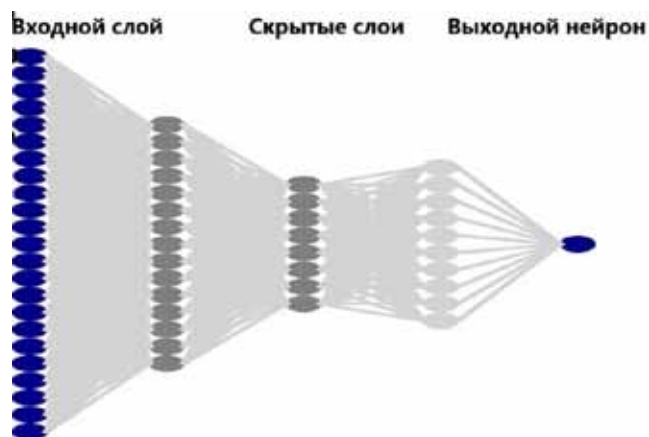


Рис. 1. Структура нейронной сети

Обученная нейросеть использовалась для оценки риска развития АГ у пациентов, чьи данные не принимали участие в обучении и тестировании нейронной сети, в итоге были получены следующие данные (табл. 1).

Конечно, без наличия верифицированного диагноза судить о точности и диагностической ценности данной нейронной сети нельзя, но тем не менее, пациенты, находящиеся по современным критериям, в группе риска развития АГ были успешно идентифицированы построенной моделью.

Таблица 1. Фрагмент спрогнозированных данных

Пациент	Риск, %
1	24
2	4,6
3	7,3
4	34
5	25
6	48
7	3,1
8	94
9	42

Таким образом представленная нейронная сеть имеет возможность оценивать риск развития АГ с точностью до 98%. После проведения дальнейших исследований, данный метод можно использовать для повышения качества клинической и лабораторной диагностики в лечебно-профилактических учреждениях.

Список литературы

1. Ambale-Venkatesh, Bharath et al. Cardiovascular Event Prediction by Machine Learning: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. // *Circ. Res.* 2017 №121 P. 1092–1101.
2. Plekhova N.G., Nevzorova V. A. et al. Scale of Binary Variables for Predicting Cardiovascular Risk Scale for predicting cardiovascular risk. Proceedings of the 2018 3rd Russian-Pacific Conf. on computer technology and applications (RPC) 2018 P. 426-430.
3. Kingma, Diederik & Ba, Jimmy. Adam: A Method for Stochastic Optimization // International Conference on Learning Representations 2014 p.

УДК 616-074

*Погорелова Е.И.¹, Буданова М.В.², Панина О.А.³
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный
медицинский университет им. Н.Н.Бурденко»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Воронеж
Pogorelova_elen_ivanovna@mail.ru¹,
mbudvgma@yandex.ru²,
media01@list.ru³*

Неоптерин как прогностический фактор течения острых респираторных инфекций

Целью исследования явилось изучение возможностей определения неоптерина в моче для оценки течения ОРВИ у детей. Определение неоптерина проводили методом прямого конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. Установлено повышение концентрации неоптерина на 1 день заболевания и положительная корреляция с выраженностью клинической симптоматики.

Ключевые слова: *неоптерин, респираторные инфекции, прогностическое значение.*

*Pogorelova E.I., Budanova M.V., Panina O.A.
Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko,
Russian Federation*

Neopterin as a predictive factor of acute respiratory infections

The aim of the article is to study the ability to determine the neopterin in urine to assess the ARVI course in children. The determination of the neopterin was performed by direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays. An increase in the concentration of the neopterin on the 1st day of illness and a positive correlation with the severity of clinical symptoms are found.

Key words: *neopterin, respiratory infections, prognostic value.*

Неоптерин представляет собой соединение с низкой молекулярной массой, относящееся к химической группе птерицинов. В организме человека он синтезируется из гуанозинтрифосфата, в первую очередь, макрофагами, а также моноцитами и дендритными клетками после их стимуляции интерфероном гамма (IFN γ) [1]. Молекулы неоптерина достаточно стабильны в отличие от IFN γ , поэтому их коли-

чественное определение может быть использовано для определения активации клеточного иммунитета и эндогенного высвобождения $IFN \gamma$ [2]. Низкая молекулярная масса позволяет неоптерину легко проходить через интравазальные структуры и посредством клубочковой фильтрации выделяться с мочой. На период полураспада этого маркера в организме человека влияет только почечная экскреция. Поэтому материалом для определения неоптерина может быть как сыворотка крови, так и моча. Отмечена соотносимая диагностическая значимость определения неоптерина в этих биологических средах [3,4].

При вирусных инфекциях уровень неоптерина повышается еще до того, как происходит образование антител, что позволяет провести раннюю диагностику и скорректировать тактику терапии [2]. После сероконверсии концентрация неоптерина в сыворотке и моче тесно коррелируют с вирусной нагрузкой, в частности у ВИЧ-1 инфицированных пациентов [3].

Изучение концентрации неоптерина было проведено при ряде инфекционных процессах: тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), грипп, парвовирус В-19, цитомегаловирусная инфекция, краснуха, вирус Эпштейна–Барр, вирусные гепатиты, кишечные инфекции, нейроинфекции, др. В исследованиях были установлены повышенные концентрации неоптерина в сыворотке крови в дебюте заболевания или в конце инкубационного периода [5,6]. При изучении инфекции нижних дыхательных путей у детей, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом, была установлена корреляция уровня неоптерина с длительностью лихорадки, выраженностью клинических симптомов [7]. Положительные существенные корреляции были установлены между уровнями сывороточного неоптерина и фактором некроза опухоли (TNF), интерлейкином 6 (IL-6) [8].

Учитывая потенциальные возможности этого биохимического маркера и неинвазивность метода определения неоптерина в моче, было проведено изучение его значимости для оценки течения острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) у детей.

Материалы и методы исследования

Неоптерин в моче определяли методом прямого конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа, используя набор для количественного определения неоптерина *in vitro* в сыворотке, плазме и моче человека, IBL International GmbH, Германия. В качестве иммобилизованных на твердой фазе специфических антигенов выступали антикроличьи IgG (козы, поликлональные),

конъюгат был представлен кроличьей антисывороткой, меченной неоптерином, конъюгированным с пероксидазой. Несвязанный компонент удалялся промывочным буфером. Интенсивность окраски, появляющаяся после инкубации с субстрато-хромагенным реагентом, была обратно пропорциональна количеству неоптерина в образце. Результаты образцов определялись непосредственно с использованием стандартной кривой. Согласно инструкции «NeopterinBiochemistry-Methods-ClinicalApplication» референтный интервал для уровня неоптерина в моче у детей 5-7 лет считался 226-405 мкмоль/моль креатинина вне зависимости от пола [9]. Для анализа использовалась утренняя порция мочи, образцы которой замораживались при температуре -24°C , максимальный срок хранения – до 2 месяцев.

Исследование неоптерина в моче проводили у детей 5-7 лет (54 пациента) с диагнозом ОРВИ, наблюдавшихся амбулаторно, на первый-второй и пятый-шестой дни заболевания. Все дети в дебюте заболевания имели умеренные симптомы интоксикации (температура тела в диапазоне $37,3^{\circ}\text{C}$ – $38,2^{\circ}\text{C}$) и катаральные признаки (боль в горле, ринорея, заложенность носа, кашель). Интенсивность клинических симптомов оценивали в баллах: 0 – отсутствие симптома, 3 – максимальная выраженность признака. Интегральная оценка выраженности клинической картины ОРВИ проводилась по среднему значению суммы баллов всех симптомов. Пациенты получали лечение согласно клиническим рекомендациям [10].

Статистический анализ полученных результатов исследования проводился с помощью программного обеспечения «STATISTICA» 6.0 (StatSoft Inc.) и приложения к программе Excel, 2010. Результаты исследования представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD) – $M \pm SD$. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. По результатам исследования концентрация неоптерина в моче на 1-2 день заболевания ОРВИ составила $899,5 \pm 145,6$ мкмоль/моль креатинина ($p=0,002$). Полученные данные превышали норму почти в 2,8 раза. У всех детей отмечалось острое течение инфекции и соответствовало первому-второму дню заболевания. Суммарная выраженность клинических симптомов ОРВИ соответствовала $8,6 \pm 2,4$ баллам. Наиболее выраженными симптомами являлись ринорея (выделения слизистого характера) – средний балл $9,1 \pm 1,9$; кашель непродуктивного характера – $7,8 \pm 2,2$ балла. При первом осмотре осложнений вирусной инфекции не было выявлено ни у одного ребенка.

В ходе динамического наблюдения (на 5-6 день) было выявлено уменьшение выраженности симптомов ОРВИ почти у 68% детей: нормализация температурной реакции, не отмечалось затруднения носового дыхания и болевых ощущений в горле; незначительный насморк сохранялся у 9 детей, носовой секрет имел серозный характер; на редкий продуктивный кашель жаловались 11 пациентов. Интегральная оценка интенсивности клинических симптомов у этих детей при повторном осмотре составила $1,1 \pm 0,5$ балла ($p < 0,01$). Среднее значение концентрации неоптерина у пациентов с положительной динамикой клинической картины составило $594,7 \pm 103,2$ мкмоль/моль креатинина, что почти в 1,5 раза ниже, чем в первый день исследования ($p < 0,05$). Установлена положительная корреляция между концентрацией неоптерина и интегральным балльным значением оценки симптомов ОРВИ у этих пациентов ($r = 0,41$).

Почти у 1/3 пациентов при повторном осмотре было установлено отсутствие положительной клинической динамики: сохранялся выраженный насморк со слизисто-гнойным характером отделяемого, затрудненное носовое дыхание, навязчивый кашель, субфебрильная температура, у 5 детей появились жалобы на боль в ухе. При обследовании отоларингологом у 18 больных был установлен риносинусит, который у 5 пациентов сочетался с острым средним отитом. Сумма баллов симптомов ОРВИ у детей без положительной динамики при повторной оценке соответствовала $8,8 \pm 2,6$ баллам ($p = 0,12$), а уровень неоптерина — $857,8 \pm 164,6$ мкмоль/моль креатинина ($p = 0,09$). Концентрация неоптерина у пациентов, имевших осложненное течение ОРВИ, была достоверно выше, чем у детей с гладким течением вирусной инфекции ($p < 0,05$).

Заключение. Исследование неоптерина в моче у детей при ОРВИ показало раннее повышение этого биохимического маркера уже на первый день заболевания и положительную корреляцию с выраженностью клинической симптоматики. Снижение концентрации неоптерина можно рассматривать как положительный прогностический признак течения ОРВИ у детей. Отсутствие тенденции к нормализации содержания неоптерина может служить дополнительным маркером негладкого течения острой респираторной вирусной инфекции у детей.

Список литературы

1. Неоптерин: новый иммунологический маркер вирусных инфекций (обзор) / Р.А. Гладких, В.П. Молочный, В.В. Малиновская, др. // Лечащий врач. 2016.- № 11. С. 42-38.
2. Hoffmann G., Wirleitner B., Fuchs D. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans // Inflammation Research. 2003. Is.8, Vol.52.- P. 313–321.
3. Neopterin in HIV-1 infection / B.Wirleitner, K. Schroecksnadel, C. Winkler, et al. // Molecular Immunology. 2005. № 42. P. 183-94.
4. Richardson K., Weinberg A. Dynamics of regulatory T-cells during pregnancy: effect of HIV infection and correlations with other immune parameters // PLOS One. 2011. № 6 (11). e28172. doi: 10.1371/journal.pone.0028172.
5. Гладких Р.А., Молочный В.П., Полеско И.В. Неоптерин как современный маркер воспаления // Детские инфекции. 2016. № 2. – С. 23-19.
6. Steven P. Gieseg, Gregory Baxter-Parker, Angus Lindsay. Neopterin, Inflammation, and Oxidative Stress: What Could We Be Missing? // Antioxidants. 2018. № 80 (7): doi:10.3390/antiox7070080.
7. Клиническая значимость маркеров острого воспаления при инфекционной патологии / К.Р. Дудина, М.М. Кутателадзе, О.О. Знойко, др. // Казанский медицинский журнал. 2014. № 95 (6). С. 915-909.
8. Association of neopterin as a marker of immune system activation and juvenile rheumatoid arthritis activity / M.M. Shady, H.A. Fathy, A. Ali, others // J Pediatr (Rio J). 2015. №91(5). P. 352-7.
9. Neopterin ELISA (RE59321). Enzyme immunoassay for the quantitative determination of neopterin in human serum, plasma and urine: instructions for Use. IBL INTERNATIONAL GMBH, Flughafenstr. 52A, 22335 Hamburg, Germany. Symbols Version 4.5 / 2015-12-07
10. Острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ) у детей: клинические рекомендации / сост. А.А.Баранов, Ю.В.Лобзин, Л.С.Намазова-Баранова, др. М.: Союз педиатров России, 2018.

УДК 620.3

*Прохорова В.А.¹, Хассан Х.¹, Старкова П.С.¹, Рубель М.С.¹,
Зайчикова М.В.², Даниленко В.Н.², Колпашников Д.М.^{1,3,4}
Университет ИТМО, Международный научный центр
Растворной химии передовых материалов и технологий¹,
Санкт-Петербург, Российская Федерация
Институт общей генетики – ИОГен РАН²,
Москва, Российская Федерация
Chemistry Department, University of Central Florida³, Central Florida
Boulevard, Orlando
Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida⁴,
Orlando, Florida, USA
prohorova@scamt-itmo.ru*

**Диагностика однонуклеотидных полиморфизмов штаммов
Mycobacterium tuberculosis с помощью ДНК-наномашин**

*Для детектирования генотипов и подтипов штаммов *M.tb* была разработана ДНК-наномашинка из гибридизационных зондов, организующих наномолекулярную структуру из ДНК-каркасов и дезоксирибозимов, которая показала способность распознавать ампликоны дцДНК за счет облегчения функции доставки F-субстрата и жесткой гибридизации через 3 коротких руки связывания ДНК.*

Ключевые слова: ДНК-нанотехнологии, *Mycobacterium tuberculosis*, однонуклеотидные полиморфизмы.

*Prohorova V.A.¹, Hassan H.¹, Starkova P.S.¹, Rubel M.S.¹,
Zaychikova M.V.², Danilenko V.N.², Kolpashchikov D.M.^{1,3,4}
ITMO University, Laboratory of Solution Chemistry of Advanced Materials
and Technologies¹, St. Petersburg, Russian Federation
Vavilov Institute of General Genetics², Moscow, Russian Federation
Chemistry Department³, University of Central Florida,
Florida Boulevard, Orlando, FL 32816-2366
Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida⁴,
Orlando, Florida, USA*

**Detection of single nucleotide polymorphisms of *Microbacteria tuberculosis*
strains with DNA-nanomachines**

*For detection of genotypes and subtypes of *Mycobacterium tuberculosis* strains, we designed a DNA-nanomachine consisting of hybridization probes and deoxyribosyme sensor organized in a nanomolecular structure on a DNA scaffolds. The nanomachine performance shows that the DNA nanomachine*

is able to recognize dsDNA amplicones by facilitating the F-substrate delivery function and rigid hybridization through 3 short DNA binding arms.

Key words: *DNA nanotechnology, Mycobacterium tuberculosis, single-nucleotide polymorphisms.*

Mycobacterium tuberculosis (M.tb) – это патогенные бактерии из семейства *Mycobacteriaceae*, являющиеся возбудителями туберкулеза у людей. В наши дни туберкулез излечим и поддается профилактике, однако он по-прежнему является одной из 10 основных причин смерти от одного единственного возбудителя инфекции во всем мире. Территориально большинство случаев заболевания туберкулезом в 2018 г. произошло в таких регионах ВОЗ, как Юго-Восточная Азия (44%), Африка (24%) и Западная часть Тихого океана (18%). По данным ВОЗ на 2018 г 78% заболели туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью. Именно поэтому типирование штаммов требуется при исследовании не только вспышек туберкулеза, но и изучении устойчивости к антибиотикам у *M.tb*. Для дифференциации точечной мутации требуются дорогостоящие инструменты ПЦР в реальном времени, часто не являющиеся доступными для диагностики в странах с высоким бременем туберкулеза. Альтернативные методы диагностики, включающие гибридизационные зонды для последовательного распознавания штаммов бактерий и вирусов не всегда обладают селективностью по отношению к единичным нуклеотидным вариациям, что имеет важное значение для правильной диагностики и успешного лечения. Обнаружение однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) в двухцепочечной ДНК играет важную роль в контексте анализа однонуклеотидных замен не только в биологической ДНК, но и в продуктах её амплификации. Целью нашей работы является разработка и тестирование ДНК-наномашин для флуоресцентного анализа ампликонов двуцепочечной ДНК гена *mazF3-1102c M.tb*.

Использование гибридизационных зондов в диагностике связано с рядом проблем. Получение доступа к сайту связывания является первой задачей, которая может быть решена с помощью пептидных нуклеиновых кислот [1] или закрытых (locked) нуклеиновых кислот [2], вытесняющих одну из цепей двойной спирали из-за расширенного сродства к оцДНК. Кроме того, зонды имеют недостаточное сродство к ампликонам двойной спирали дцДНК. Данная проблема решается путем получения оцДНК либо с помощью асимметричной ПЦР [3,4], либо путем воздействия на ампликоны лямбда экзонуклеазой [5], которая гидролизует одну из цепочек ДНК. Была разработана дезоксирибозимная ДНК-наномашина, способная связывать дцДНК, а

также распознавать однонуклеотидные мутации с высокой селективностью. ДНК-наномашина была применена для обнаружения ампликонов дцДНК для будущего обнаружения лекарственно устойчивых штаммов *Mtb*.

Каталитические молекулы ДНК, известные также как дезоксирибозимы [6], являются биотехнологическими инструментами для анализа нуклеиновых кислот, чья легко модифицируемая конструкция позволяет обнаруживать различные аналиты [7]. При таком подходе элементы дезоксирибозима связываются с ДНК- или РНК-аналитом и формируют дезоксирибозимный каталитический центр, который расщепляет флуорогенный субстрат (F-субстрат), в результате чего образуется флуоресцентный сигнал. Активные ДНК-ферменты способны многократно расщеплять универсальный субстрат. Основными преимуществами дезоксирибозимов являются регулируемая конструкция, химическая стабильность, чувствительность за счет усиления каталитического сигнала с течением времени и экономичность синтеза. В данном случае мы применили альтернативу аллостерически регулируемым сенсорам дезоксирибозимов [8] и зондам молекулярных маяков [9] - структуру бинарного дезоксирибозима (BiDz) [10], которая в отличие от первых не только устраняет фоновую активность при отсутствии аналита за счет изменения концентрации цепей сенсоров, но и обеспечивает надлежащую селективность к однонуклеотидному полиморфизму [11,12].

Любой гибридизационный зонд имеет проблемы с раскручиванием и распознаванием стабильной дцДНА. Поэтому оснащение зонда BiDZ функцией расплетения ДНК поможет облегчить его доступ к целевой последовательности и достичь лучшего предела детектирования (LOD). Учитывая каталитическую эффективность ДНК, эту проблему можно решить за счет сочетания высокоафинного связывания зонда с ампликон и доставки субстрата к активному участку BiDZ [15]. Тем не менее, существует вероятность того, что ДНК платформы большой длины будут складываться во вторичные структуры, что приведет к уменьшению сродства к интересующему фрагменту. В данном исследовании комплекс из трех цепей (T1, T2, T3, рис. 1Б) формирует ДНК-наномашину. Рука 3 входит в цепочку DzA, которая соединена с T2 и имеет конец на руке 1, в то время как DzB отделяется от платформы для обеспечения низкого фона при отсутствии исследуемого аналита [16]. В частности, связывающие руки 1, 3, 4 способствуют раскрытию вторичной структуры аналита, что облегчает позиционирование BiDz на прицельной последовательности, в то время как рука 2 отвечает за дифференциацию одиночных несовпадений.

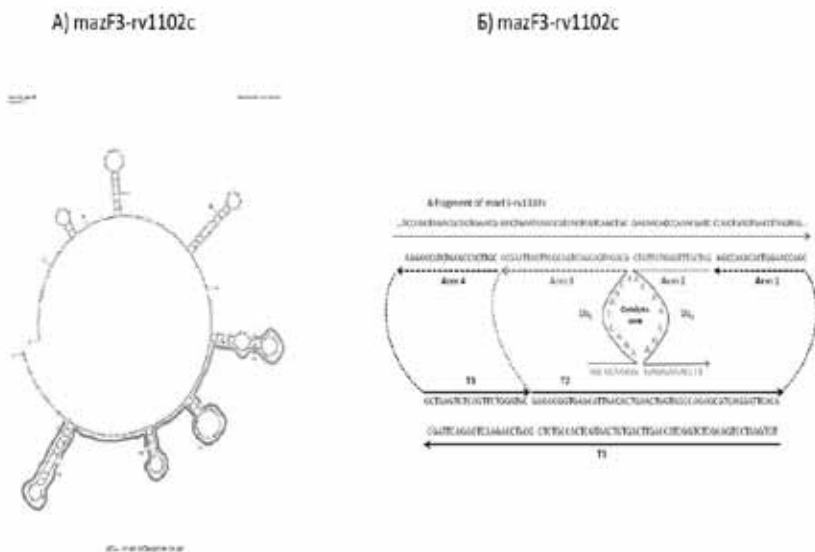


Рис. 1. Дизайн ДНК-наномшины для диагностики ДНК А) Вторичная структура mazF3-rv1102c бактерии *Mtb*, смоделированная при помощи Mfold при 55°C in the 120 mM Na⁺, 50 mM Mg²⁺. Б) Структура ДНК-наномшины в комплексе с ДНК анализом

Таким образом, создание ДНК-наномшины – это воплощение альтернативного подхода для обнаружения ампликонов двухцепочечной ДНК, который потенциально может найти применение в молекулярной диагностике человеческих заболеваний, в частности обнаружения специфических генов систем токсинов-антитоксинов (ТА) II типа, связанные с *M. tb*, где эти однонуклеотидные полиморфизмы коррелируют со штаммом, принадлежащим к определенному генотипу.

Материалы и методы. Все гибридизационные зонды и наномшины были первоначально оптимизированы с использованием синтетических оцДНК-аналитов. Нагревание олигонуклеотидов с последующей самосборкой окончательно формирует структуру ДНК-наномшины. Праймеры были разработаны для получения ампликонов, содержащих области, связанные с SNP. Собранные наномшины анализировали в полиакриламидном геле. Флуоресценцию образцов измеряли после инкубации при 55 °C в течение 60 мин. и 180 мин на планшетном флуориметре Infinite 200, Tecan. Образцы инкубировали при 55°C

в реакционном буфере (50 мМ HEPES, pH 7.4, 50 мМ MgCl₂, 150 мМ KCl, 15 мМ NaCl).

Результаты и обсуждение. Для возможности генотипирования *Mtb* был спроектирован ViDz сенсор и ДНК наномашина для гена mazF3-rv1102с для селективного и чувствительного детектирования генотипов и подтипов Haarlem и LAM, в соответствии со схемой типизации штаммов *Mtb*. Затем мы исследовали способность различных ViDz конструкций обнаруживать синтезированные ампликоны оцДНК и дцДНК. После 60 мин. анализа все сенсор выдаёт значительный детектируемый сигнал выше отрицательного контроля в присутствии специфических аналитов, тенденция которого подтверждается результатом, полученным через 3 часа инкубации (рис. 2).

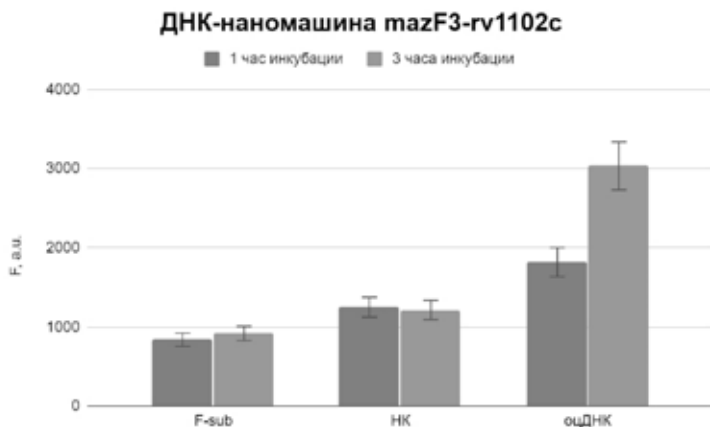


Рис. 2. Обнаружение одноцепочечного аналита при помощи ДНК-наномашин. Цепи Dza(20nM) и Dzb(20nM) и F-sub (200 nM) инкубировались в присутствии 1 nM синтетического одноцепочечного ДНК аналита в 55 °С, шкала с F-sub содержит только 200nM F-sub в реактивном буфере, негативный контроль (НК) не содержит ДНК аналита

Заключение. Исследование показывает способность ДНК-наномашин распознавать ампликоны дцДНК за счет облегчения функции доставки F-субстрата и жесткой гибридизации через 3 коротких руки связывания ДНК, в то время как, напротив, ViDz, не имея этих двух характеристик, демонстрирует слабую способность. Кроме уже разработанного сенсора, мы работаем над следующими

ДНК-наномашинами для varC47, varC37, varC38-2 и varC38-3, чтобы иметь возможность идентифицировать девять мутаций типизации штаммов *Mtb* [17].

Список литературы

1. Smolina I V., Frank-Kamenetskii MD. PNA openers and their applications for bacterial DNA diagnostics. *Methods Mol Biol.* 2014. doi:10.1007/978-1-62703-553-8_10
2. Ruthig GR, DeRidder BP. Fast quantitative PCR, locked nucleic acid probes and reduced volume reactions are effective tools for detecting *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA. *Dis Aquat Organ.* 2012. doi:10.3354/dao02420
3. Citartan M, Tang TH, Tan SC, et al. Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2012. doi:10.3998/ergo.12405314.0003.022
4. Ang GY, Yu CY, Chan KG, Singh KKB, Chan Yean Y. Development of a dry-reagent-based nucleic acid-sensing platform by coupling thermostabilised LATE-PCR assay to an oligonucleotide-modified lateral flow biosensor. *J Microbiol Methods.* 2015. doi:10.1016/j.mimet.2015.08.024
5. Brinker A, Schulze H, Bachmann T, Möller R. Lambda exonuclease pre-treatment for improved DNA-chip performance depends on the relative probe-target position. *Biosens Bioelectron.* 2010. doi:10.1016/j.bios.2010.07.011
6. Breaker RR, Joyce GF. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol.* 1994. doi:10.1016/1074-5521(94)90014-0
7. Liu J, Cao Z, Lu Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem Rev.* 2009. doi:10.1021/cr030183i
8. Stojanovic MN, de Prada P, Landry DW. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *J Am Chem Soc.* 2001. doi:10.1021/ja0038171
9. Tyagi S, Kramer FR, Lizardi PM. Hybridization probes for nucleic acid detection, universal stems and kits. 1994;PCT/US94/1(February):1-81.
10. Mokany E, Bone SM, Young PE, Doan TB, Todd A V. MNazymes, a versatile new class of nucleic acid enzymes that can function as biosensors and molecular switches. *J Am Chem Soc.* 2010. doi:10.1021/ja9076777
11. Gerasimova Y V., Yakovchuk P, Dedkova LM, Hecht SM, Kolpashchikov DM. Expedited quantification of mutant ribosomal RNA by binary deoxyribozyme (BiDz) sensors. *RNA.* 2015. doi:10.1261/rna.052613.115
12. Gerasimova Y V., Hayson A, Ballantyne J, Kolpashchikov DM. A single molecular beacon probe is sufficient for the analysis of multiple nucleic acid sequences. *ChemBioChem.* 2010. doi:10.1002/cbic.201000287

13. Kolpashchikov D.M. A Binary Deoxyribozyme for Nucleic Acid Analysis. *ChemBioChem*. 2007. doi:10.1002/cbic.200700384
14. Kolpashchikov D.M. Split DNA enzyme for visual single nucleotide polymorphism typing. *J Am Chem Soc*. 2008. doi:10.1021/ja711192e
15. Cox A.J, Bengtson HN, Gerasimova YV., Rohde KH, Kolpashchikov DM. DNA Antenna Tile-Associated Deoxyribozyme Sensor with Improved Sensitivity. *ChemBioChem*. 2016. doi:10.1002/cbic.201600438
16. Cox AJ, Bengtson HN, Rohde KH, Kolpashchikov DM. DNA nanotechnology for nucleic acid analysis: multifunctional molecular DNA machine for RNA detection. *Chem Commun*. 2016;52(99):14318-14321. doi:10.1039/C6CC06889H
17. Zaychikova M V., Zakharevich N V., Sagaidak MO, et al. Mycobacterium tuberculosis Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic polymorphisms and functional properties and the possibility of their use for genotypi ng. *PLoS One*. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0143682
18. Bengtson HN, Homolka S, Niemann S, et al. Multiplex detection of extensively drug resistant tuberculosis using binary deoxyribozyme sensors. *Biosens Bioelectron*. 2017;94(March):176-183. doi:10.1016/j.bios.2017.02.051

УДК 618.396:618.36-07

Раббимова Г.Т.¹, Мухамадиев Н.К.², Дустов С.И.³
Самаркандский государственный медицинский институт¹,
Узбекистан, Самарканд
Самаркандский государственный университет², Узбекистан,
Самарканд
Бухарский инженерно-технологический институт³,
Узбекистан, Бухара
gulnora_1968_r@mail.ru¹, m_nurali@mail.ru²,
laylo.uzakova@mail.ru³

Диагностическое значение параметров эндогенной интоксикации и содержания маркеров микроорганизмов при угрозе прерывания беременности

В статье описаны изменения микробиоценоза влагалища и параметров эндогенной интоксикации у беременных с цервиковагинальными инфекциями; в зависимости от количественного изменения микроорганизмов во влагалище и шейке матки, развивается синдром эндогенной интоксикации, что приводит к угрозе прерывания беременности.

Ключевые слова: угроза прерывания беременности, цервико-вагинальные инфекции, эндогенная интоксикация.

Rabbimova G.T.¹, Muhamadiev N.K.², Dustov S.I.³
Samarkand State Medical Institute¹,
Uzbekistan, Samarkand
Samarkand State University²,
Uzbekistan, Samarkand
Bukhara Engineering Technological Institute³,
Uzbekistan, Bukhara

Diagnostic value of endogenous intoxication parameters and content of microorganism markers in threateness of abortion of pregnancy

The article describes changes in vaginal microbiocenosis and parameters of endogenous intoxication in pregnant women with cervico-vaginal infections; depending on the quantitative changes in microorganisms in the vagina and cervix, the syndrome of endogenous intoxication develops, which leads to the threat of termination of pregnancy.

Key words: *threatening premature birth, cervico-vaginal infections, endogenous intoxication.*

Одной из актуальных проблем современного акушерства остаются цервико-вагинальные инфекции (ЦВИ), по данным ВОЗ, наблюдаются у 25-45% беременных [12]. Нарушения микробиоценоза влагалища приводят к развитию клинических проявлений инфекции в виде бактериального вагиноза, вульвовагинального кандидоза, аэробного вагинита или их сочетаний [2,3,8,10]. Инфекции, не диагностированные своевременно у беременных, могут стать причиной высокой частоты угрозы и/или преждевременного прерывания и других осложнений, поэтому необходима их ранняя диагностика [4,5,6,7]. Недостаточно изучены вопросы значимости ЦВИ у беременных, осложненной угрозой прерывания, взаимосвязь инфекции с показателями антиоксидантной системы и степенью эндогенной интоксикации (ЭИ) [1,9,10]. В связи с этим анализ прогностической значимости критериев эндотоксикоза и параметров объективизации состояния беременных в оценке течения, исхода беременности и родов, прогноза неблагоприятного течения беременности у женщин с ЦВИ представляется актуальным и оправданным.

Цель исследования изучить диагностические критерии перехода ЦВИ у беременных в осложнение в виде угрозы прерывания беременности.

Материал и методы исследования. Обследованию подверглись 164 беременных с ЦВИ, из них 115 беременных с угрозой прерывания беременности в различные сроки гестации (основная группа) и 49 беременных без угрозы прерывания (группа сравнения). Средний возраст беременных составил $24,82 \pm 3,98$ года. Преобладали беременные в возрасте 19-24 лет: 29 (58%) в контрольной и 77 (49%) в основной группе.

Определяли маркеры ЭИ – МСМ при 254 и 280 по методу Н.И. Габриэлян (1985). Количественное определение активности каталазы (КА) крови проводили по методу М.А. Королюк и соавт. в динамике [50, 59; с. 13-18], малонового диальдегида по С.Г. Конюховой (1995).

Наряду с общепринятыми микроскопическим и микробиологическим методами выявления микробиоценоза влагалища и шейки матки, для количественного выявления микроорганизмов применяли метод ГЖХ, с помощью которого выявляли маркеры микроорганизмов, характерные для каждого микроорганизма. Идентификацию маркеров микроорганизмов осуществляли на газовой-хроматографической масс-спектрометрической системе Agilent Technologies 5977A MSD.

Полученные результаты. Как известно, универсальным маркером окислительного стресса является малоновый диальдегид, оказывающий повреждающее действие на биомембраны, способствует увеличению их проницаемости для ионов кальция в клетке и др. Изученные показатели антиоксидантной системы приведены в таблице 1. Показатель МДА у пациенток основной группы и группы сравнения превышал контрольные значения соответственно в 1,9 и 1,2 раза, это свидетельствует об активизации процессов ПОЛ и снижении антиоксидантной защиты. Уровень фермент антиоксидантной системы каталазы у беременных основной группы снижался в 3,9 раза, группы сравнения – в 2,8 раза. Содержание МСМ₂₅₄ возрастало соответственно в 2,4 и 1,9 раза, МСМ₂₈₀ – в 2,1 и 1,8 раза.

Маркеры ЭИ свидетельствуют об активизации инфекционного процесса, риске преждевременного прерывания беременности, избыточное их накопление оказывает токсическое действие на ткань плаценты, нарушая ее гемодинамику и барьерные функции (табл. 1).

Таким образом, при ЦВИ развивается ЭИ, наиболее выраженная у беременных основной группы.

При микроскопическом исследовании содержимого влагалища показатели микрофлоры у беременных с ЦВИ отличались от показателей во влагалищном мазке.

Таблица 1. Параметры эндогенной интоксикации и антиоксидантной системы у обследованных беременных

Показатель	ФБ, n=50	Группа сравнения, n=49	Основная группа, n=115
МДА, мкмоль/л	3,6±0,03	5,8±0,1***	6,87±0,1***^^^
Каталаза, мккат/с*л	0,9±0,01	0,32±0,01***	0,23±0,01***^^^
МСМ254, у.е.	0,22±0,001	0,42±0,01***	0,53±0,01***^^^
МСМ280, у.е.	0,26±0,002	0,46±0,01***	0,55±0,01***^^^
КУБ, у.е.	1,2	1,4±0,1*	1,04±0,01***^^^
МДА/кат, у.е.	4	18,1±0,01***	29,87±0,02***^^^

Примечание: * – различия относительно данных группы с ФБ значимы (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$); ^ – различия относительно данных группы сравнения значимы (^^^ – $p < 0,001$).

В основной группе преобладали лейкоциты от 20 до 40 в поле зрения и составили 26,2% (30), напротив 22,4% (11) в группе сравнения, а также *Gardnerella vag.* встречались с частотой 17,4%, в группе сравнения 6,1%. У 111 (96,5%) женщин основной, у 46 (93,9%) группы сравнения и у 3 (6%) контрольной группы в позитивных образцах выросли преимущественно колонии стафилококков и энтеробактерий. Вся выявленная условно-патогенная микрофлора имела диагностически значимые высокие цифры КОЕ/мл $> 10^5$.

При бактериологическом исследовании выявлена также общая обсемененность цервикального канала, уровень обсемененности в основной группе был выше. Нарушение количественных соотношений в бактериальном сообществе генитального тракта приводит к развитию клинических проявлений ГИ в виде угрозы прерывания и другим осложнениям беременности.

В диагностике инфекции применялся метод ГЖХ, с помощью которого изучен состав жирных кислот, оксикислот и альдегидов, входящих в состав липидов микробной клетки и метаболитов. ГЖХ позволяет одновременно определять маркеры условно-патогенной флоры, а также «скрытую» урогенитальную инфекцию как качественно, так и количественно, и является экспресс-методом.

Таблица 2. Общая обсемененность цервикального канала у беременных с генитальными инфекциями, КОЕ/мл

Уровень обсемененности	Основная группа, n=115		Группа сравнения, n=49		χ^2	P
	абс.	%	абс.	%		
Низкий (0-103)	-	-	-	-		
Средний (103-9×104)	42	36,5	30	61,2	7,49	<0,01
Высокий (105-9×105) и выше	73	63,5	19	38,8	8,51	<0,01

Таблица 3. Уровень маркеров микроорганизмов содержимого влагалища (кл/мл) у беременных, определенных методом ГЖХ

Вид микроорганизма	Маркер (база MIS MIDI «Sherlock», 1992)	Основная группа, n=75	Группа сравнения, n=23
Цитомегаловирус	Холестадиенон	2,17·10 ⁵	1,92·10 ³
Вирус простого герпеса 2-го типа	Холестендиол	3,24·10 ⁵	2,13·10 ³
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Гидроксиэйкозановая кислота (3h20)	2,58·10 ⁷	1,88·10 ⁴
<i>E. coli</i>	3-оксимиристиновая кислота	2,44·10 ⁸	1,98·10 ⁴
<i>Enterococcus faecalis</i>	Циклонадекановая кислота (19сус)	8,23·10 ⁷	6,23·10 ³
<i>Staphylococcus spp.</i>	Антеизононадекановая кислота (a19)	2,10·10 ⁸	1,70·10 ⁵
<i>Streptococcus agalactiae</i> B	Декановая кислота (C10:0)	7,07·10 ⁹	4,02·10 ⁵
Грибы рода <i>Candida</i>	Гептадеценная кислота (C17:1)	7,40·10 ⁷	5,63·10 ⁴
<i>Lactobacillus</i>	1-метиленактадекановая кислота (C19сус)	5,29·10 ²	5,44·10 ³

Обнаружено, что каждому виду микроорганизмов присущ свойственный ему состав жирных кислот. При этом выявлены не только

маркеры микроорганизмов (качественная оценка), но и количественное их содержание. При ЦВИ, осложненной угрозой прерывания беременности, уровень маркеров микроорганизмов имеет более высокие показатели (в титре) концентрации 10^{5-9} и выше, тогда как в группе сравнения их титр был в пределах до 10^5 (табл. 3). Выявлена корреляционная зависимость между маркерами микроорганизмов по ГЖХ и некоторыми показателями ЭИ: МСМ₂₅₄ и 3-оксимиристиновая кислота (титр маркера 10^5 и $>$) ($r=0,71$), МСМ₂₅₄ и гидроксиэпикозановая кислота (титр маркера 10^5 и $>$) ($r=0,81$), МДА и декановая кислота (титр маркера 10^5 и $>$) ($r=0,73$), МДА и гептадеценовая кислота (титр маркера 10^5 и $>$) ($r=0,69$), МСМ₂₅₄ и гептадеценовая кислота ($r=0,66$).

Таким образом, у беременных с ЦВИ, осложненной угрозой прерывания беременности выявляется повышенный уровень обсемененности микроорганизмами влагалища и цервикального канала, что характеризуется показателями эндогенной интоксикации и микробной нагрузки, характеризующиеся содержанием маркеров микроорганизмов (КОЕ при бактериологическом исследовании и титр микроорганизмов по ГЖХ), которые является диагностическим критерием. Так, развитие угрозы прерывания беременности у беременных с ЦВИ связано со снижением показателей антиоксидантной защиты (каталазы) и увеличением показателей эндогенной интоксикации (МДА, МСМ, КУБ), а также увеличением содержания маркеров микроорганизмов.

Список литературы

1. Avery S.V. Molecular targets of oxidative stress // *Biochemical Journal*. 2011. Vol. 434, №2. P. 201-210.
2. Bagnall P., Rizzolo D. Bacterial vaginosis: A practical review // *J. Amer. Acad. of PAs*. 2017. Vol. 30, №12. P. 15-21.
3. Donders G.G. et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy // *Brit. J. Obstet. Gynaec.* 2009. Vol. 116, №10. P. 1315-1324.
4. Румянцева Т.А. Оптимизация клинико-лабораторных подходов к диагностике вульвовагинальных и цервикальных инфекций: Дис. ... канд. мед. наук. М., 2014. 197 с.
5. Рыбина Е.В. Современные методы оценки микробиоценоза влагалища // *Журн. акуш. и жен. бол.* 2015. Т. 64, №1. С. 53-66.
6. Сидельникова В.М. Инфекция как фактор риска невынашивания беременности // *Гинекология*. 2008. Т. 10. №. 5. С. 28-30.

7. Синякова А.А. и др. Микробиоценоз влагалища в первом триместре беременности у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе // Журн. акуш. и жен. бол. 2016. Т. 65, №4. С. 44-49.

8. Хамошина М.Б. и др. Нарушения микробиоценоза урогенитального тракта: грани проблемы, перспективы коррекции и профилактики // Вопр. гин., акуш. и перинатол. 2009. Т. 8, №5. С. 69-74.

9. Хардилов А.В. и др. Влияние эндогенной интоксикации при различных вариантах неосложненного пиелонефрита беременных на состояние маточно-плацентарно-плодового кровотока // Акуш. и гин. 2016. №10. С. 48-51.

10. Чайка В.К., Антонова О.Л. Микробиоценоз влагалища, как фактор риска осложнения течения беременности (литературный обзор) // Мед.-соц. Пробл. семьи. 2016. Т. 21, №2. С. 61-65.

11. Черных С.В. Некоторые показатели эндогенной интоксикации в динамике физиологической беременности и раннем послеродовом периоде // Таврический мед.-биол. вестн. 2011. №3, ч. 1. С. 260-261.

12. Янковский Д.С. Микробиом и здоровье женщины // Репродуктивна эндокринологія. 2015. №4. С. 24.

УДК 616-006

Рисс М.Е.¹, Науменко Е.С.¹, Черенков В.Г.²

Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого¹

(Великий Новгород, Россия)

ГБОУЗ Областной клинический онкологический диспансер²

(Великий Новгород, Россия),

Институт медицинского образования

Новгородского государственного университета,

Великий Новгород

mari.riss.98@mail.ru, Orochi070@gmail.com, v.g.cherenkov@yandex.ru

Цифровые подходы в диагностике ранних признаков поверхностно распространяющихся меланом

В исследовании изучена возможность применения метода USB микроскопической диагностики для выявления поверхностных меланом в ранней стадии малигнизации. Нами использован портативный USB микроскоп, подключаемый к компьютеру. Данный способ может быть применен для ранней диагностики меланом с целью предотвращения развития онкологического процесса.

Ключевые слова: меланома, невус, диагностика, малигнизация.

*Riss M.E.¹, Naumenko E.S.¹, Cherenkov V.G.²
Yaroslav-the-Wise Novgorod State University¹
(Veliky Novgorod, Russia), GOBUZ Regional Clinical Oncology²
(Veliky Novgorod, Russia),
Institute of medical education of Novgorod state University,
Veliky Novgorod*

Digital approaches in the diagnosis of early signs of surface-spreading melanoma

The study investigated the possibility of using the USB microscopic diagnostics method to detect surface melanomas in the early stage of malignancy. We used a portable USB microscope, connected to a computer. This method can be used for early diagnosis of melanomas in order to prevent the development of cancer.

Key words: *melanoma, nevus, diagnosis, malignization.*

Актуальность. Нет ни одного жителя нашей планеты, который не имел бы как минимум одно родимое пятно на каждом покрове. На теле каждого человека по данным разных авторов присутствует от 10 до 200 пигментных невусов. В большинстве случаев наличие этих образований не представляет проблемы, кроме – их малигнизации. По результатам статистики нашей области 1 место занимают узловые меланомы кожи, характеризующиеся первичным вертикальным ростом и считающиеся самым неблагоприятным в плане прогноза типом опухоли, они составляют 47%, что обусловлено не своевременной диагностикой [1]. Меланома кожи развивается вследствие злокачественного превращения меланоцитов и меланобластов. Эмбриогенетически меланоциты являются производными нейроэктодермального гребешка, из которого их предшественники мигрируют в кожу и другие органы на ранних сроках внутриутробного развития. Меланоциты кожи имеют вид отросчатых клеток, располагающихся на базальной мембране среди элементов росткового слоя эпителия. Их основной функцией является выработка пигмента меланина [1]. По мнению многих авторов фаза горизонтального роста меланомы (обычно до 6 мм) сменяет фазу радиального роста. Обычно меланокитарные невусы выглядят как плоские или слегка выпуклые пятна, от различных оттенков коричневого до серого, голубого и даже черного цвета, с четким, ровным контуром и гладкой поверхностью, величиной не более 0,4–0,5 см. Наряду с этим, нередко, у детей могут встречаться большие (до 1,0 см и более) и даже гигантские невусы, занимающие кожу обширных анатомических областей. Некоторые невусы могут иметь поверхность с папиллярными и бородавчатыми

(веррукозными) разрастаниями и волосяным покровом. Меланома кожи во 2-й фазе может стремительно прогрессировать. Чтобы это предотвратить, важно диагностировать злокачественное новообразование в фазе горизонтального роста [2].

Цель исследования: изучить возможность USB микроскопической диагностики с целью выявления поверхностных меланом на ранних стадиях малигнизации.

Материалы и методы исследования. Для обнаружения ранних признаков трансформации нами использован портативный USB микроскоп с увеличением от 50х до 500х со встроенной подсветкой, подключаемый к компьютеру. Произведена предварительная обработка невуса специальным красителем. Выдан патент на изобретение. Данный способ апробирован на 35 пациентах на базе ГОБУЗ НОКОД (г. Великий Новгород). Интерпретация результатов проводилась непосредственно на компьютере. В целях топографической оценки по сегментам после получения фотографии с угла на угол наносились две линии. Для определения злокачественности/доброкачественности новообразований кожи использовали алгоритм ABCD и расчет общего дерматоскопического индекса на основе коэффициента, полученного по балльной системе ABCD учитываются следующие признаки: асимметрия, четкость границ, цвет, количество дерматоскопических структур.

Результаты исследования. С использованием USB-диагностики нами исследовано 10 внутридермальных невусов, 4 старческих кератома и 12 смешанных невусов. В 2 случаях установлен меланоз Дюбрейля и в одном - лентиго. У 10 больных установлены пограничные невусы, в том числе 5- потенциально злокачественные, при которых коллагеновые волокна по краям невуса и в одном сегменте внутренней части были неровные, имели резкий обрыв, местами хаотичное расположение.

Выводы. Таким образом, предварительные результаты компьютерной USB микроскопии со специальным красителем позволяют получить данные о внутренней структуре новообразования, выявить которую при других методах не представляется возможным. Таким образом, применяя данный метод, можно оценить злокачественные новообразования на ранних стадиях распространения, что способствует более эффективному лечению пациентов и повышению качества диспансеризации. Также возможно применение данного метода исследования в телемедицине.



Рис. 1, 2. Аппарат для USB-диагностики



Рис. 3. Обследованные пациенты

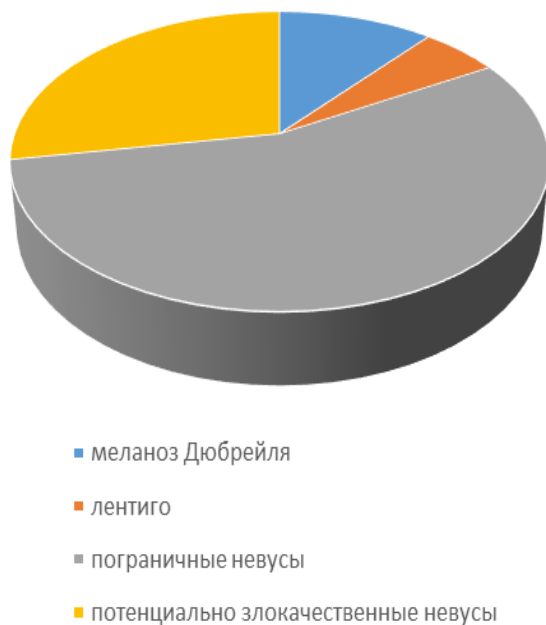


Рис. 4. Результаты USB-микроскопии

Список литературы

1. Ильина Н.Г., Зубарев А.К. Клиническая и дерматоскопическая характеристика диспластических невусов, Сибирский онкологический журнал Л. 2015. 29-30

2. Кушнир В. А., Катилов А. В., Магдебурга С. А. Методика обследования пациентов с невусами и меланомой кожи// Военно-медицинский клинический центр Центрального региона (г. Винница). Медицинский университет им. Н. И. Пирогова; 2015 52-54 стр.

УДК 575

*Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Семенов А.В.,
Денисова А.Р., Тотолян А.А.*
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
Санкт-Петербург
Sajgalinam@mail.ru

Современные подходы к генодиагностике при орфанных иммунодефицитах

Орфанные первичные иммунодефициты (ПИД) – редко встречающиеся наследственные заболевания, приводящие к нарушениям в работе иммунной системы. Сложность постановки диагноза обусловлена недостаточностью информации о патогенезе и генетических причинах заболеваний. Применение современных методов генодиагностики необходимо для установления новых генов-кандидатов орфанных ПИД.

Ключевые слова: *первичные иммунодефициты, орфанные заболевания, генетическая диагностика.*

*Saitgalina M.A., Ostankova Ju.V., Semenov A.V.,
Denisova A.R., Totolian A.A.*
Saint-Petersburg Pasteur Institute
Saint Petersburg

Modern approaches to genetic diagnosis for orphan immunodeficiencies

Orphan primary immunodeficiencies (PIDs) are rare hereditary diseases that lead to the impaired functions in the immune system. The difficulties in diagnosis are related with lack of data about the pathogenesis and genetic causes of the diseases. Identification of new candidate genes of orphan PIDs takes implication of modern methods of genetic diagnosis.

Key words: *primary immunodeficiencies, orphan disease, genetic diagnosis.*

Введение. Первичные иммунодефициты (ПИД) – гетерогенная (неоднородная) группа наследственных заболеваний, приводящих к нарушению в работе иммунной системы. Особого внимания заслуживают ПИД, относящиеся к орфанными болезням. Орфанными или «сиротскими» заболеваниями называют редкие заболевания, затрагивающие небольшую часть популяции [1].

Клинические проявления различных орфанных иммунодефицитов могут сильно варьировать, некоторые из них характеризуются периодичностью возникновения приступов [2]. Приступы могут различаться по продолжительности и тяжести состояния пациента, могут приводить к летальным исходам. Поэтому создание определенных алгоритмов лабораторной диагностики при работе с такими пациентами остается актуальной задачей. А поскольку на данный момент отсутствует четкое представление об этиологии и развитии многих орфанных ПИД, зачастую диагноз невозможно поставить без выполнения генетических тестов с использованием современных подходов, таких как секвенирование ДНК по Сенгеру и полногеномное/полноэкзомное секвенирование.

Цель представленной работы: усовершенствование алгоритмов генетической диагностики для поиска новых мутаций, ассоциированных с орфанными заболеваниями.

Материалы и методы. Материалом служила цельная кровь пациентки (девочка 13 лет). С 2017 года у ребенка наблюдались периодические выраженные отеки губ, припухлость щек, рецидивирующий стоматит. Из образца крови была экстрагирована ДНК с помощью набора «РИБО-ПРЕП» («ЦНИИ Эпидемиологии», Москва). Было выполнено секвенирование по Сенгеру восьми экзонов и экзон-интронных регионов гена *SERPING1* на капиллярном секвенаторе «Applied Biosystems 3500». Кроме того, было проведено полноэкзомное секвенирование препарата ДНК пациентки на платформе Illumina MiSeq.

Результаты и обсуждение. При обследовании в 2018 году выявлены антитела к ННУ 6 типа, к ЦМВ и ЭБВ; титр АСЛО – 303 МЕ/мл. Пациентка получала изопринозин, иммунофан внутримышечно; после отека нижней губы внутримышечно вводился дексаметазон со слабо-выраженной положительной динамикой. При обследовании в феврале 2020 года обнаружена скрытая кровь (+++) в кале, титр антинуклеарного фактора составлял 1:1280, антитела к ДНК – 12,6 Ед/мл.

Предполагаемый изначально диагноз Наследственный ангионевротический отек (НАО) относится к орфанным ПИД. Известен довольно обширный перечень мутаций в кодирующих участках гена

SERPING1, отвечающих за развитие этого заболевания [3]. В результате проведенного секвенирования по Сенгеру гена *SERPING1* нуклеотидные замены выявлены не были.

Полноэкзомное секвенирование позволило установить некоторые точечные мутации в генах, кодирующих белки протеолитических систем плазмы крови, в частности в генах *F13A1* и *F5*. Согласно базе данных ClinVar, обнаруженные однонуклеотидные замены являются миссенс-мутациями, то есть ведут к замене аминокислоты в последовательности белка. Выявленная мутация гена *F13A1* g.6174866 G>A ведет к замене аминокислоты Pro на Leu в 565 положении полипептида А фактора коагуляции F13 (P565L). Мутация гена *F5* g.169511755 T>C приводит к замене Lys на Arg в 858 положении аминокислотной последовательности фактора F5 (K858R). Обе мутации имеют статус неопределенной клинической значимости, однако, предположительно, могут вызывать дефицит кодируемых полипептидов. Нарушение функций этих белков может нарушать каскады свертываемости крови, влиять на нормальную проницаемость сосудов, участвовать в образовании отеков.

Кроме описанных выше, выявлена точечная мутация гена *MUTYH*, кодирующего ДНК-гликозилазу, вовлеченную в репарацию окислительных повреждений ДНК и сигнальный апоптоз клеток. Обнаруженная миссенс-мутация g.45797505 C>G ведет к замене в аминокислотной последовательности белка Gln310His. Не смотря, на то, что клиническая значимость этой мутации остается под вопросом (согласно ресурсу ClinVar), есть работы, показывающие причастность ряда мутаций этого гена к наследственной предрасположенности к колоректальному раку, называемому *MUTYH*-ассоциированным полипозом [4,5].

Выводы. Как было сказано ранее, в некоторых случаях приступы у пациентов, страдающих орфанными иммунодефицитами, могут быть жизнеугрожающими. Серьезность ситуации усугубляется непредсказуемостью начала развития приступа, его тяжести и длительности. По литературным данным триггерными факторами для начала эпизода могут послужить инфекционные заболевания (в том числе госпитальные), медицинские вмешательства, прием лекарственных препаратов, механические травмы, стресс, гормональные факторы и другие [6].

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что своевременная постановка диагноза, а, следовательно, назначение действенной терапии, необходима как для улучшения качества жизни пациента, облегчения болей, так и для предотвращения летальных исходов.

Учитывая, тот факт, что этиопатогенез многих орфанных ПИД остается не установленным, современные подходы к генетической диагностике таких болезней являются необходимым инструментом для установления генов-кандидатов заболевания, и требуют проработки алгоритма их применения.

Список литературы

1. EURORDIS. What is a rare disease & European Organisation for Rare Disease; 2010. http://www.eurordis.org/sites/default/files/publications/Fact_Sheet_RD.pdf. Accessed 18 March 2016;
2. European Commission. Rare disease – What are they? 2013 /cited 19 February 2016//http://ec.europa.eu/health/rare_diseases/policy/index_en.htm;
3. Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Longhurst HJ et al. // International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. Allergy Asthma Clin Immunol 2010. P. 6:24;
4. Abduljaleel Z, Athar M, Al-Allaf FA et al. // Association of functional variants and protein-to-protein physical interactions of human MutY homolog linked with familial adenomatous polyposis and colorectal cancer syndrome. Noncoding RNA Res. 2019. 4(4): 155–173;
5. Dominguez-Valentin M, Nakken S, Tubeuf H et al. // Identification of genetic variants for clinical management of familial colorectal tumors. BMC Med Genet. 2018. 19: 26;
6. Zotter D, Csuka D, Szabo E et al. // The influence of trigger factors on hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. Orphanet J Rare Dis, 2014.

УДК 57.083.2

*Серикова Е.Н., Останкова Ю.В., Семенов А.В.
ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера»
Санкт-Петербург
genista.bio@gmail.com*

Анализ специфичности и чувствительности метода выявления вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке

Проанализированы специфичность и аналитическая чувствительность разрабатываемого метода выявления ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке в плазме крови с использованием гибридационно-флуоресцент-

ной детекции в режиме «реального времени». Чувствительность метода при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы составила 10 МЕ/мл. Метод может применяться для скрининга в различных группах риска.

Ключевые слова: вирус гепатита В, ВГВ, occult hepatitis B, скрытый гепатит В.

*Serikova E.N., Ostankova Y.V., Semenov A.V.
Saint-Petersburg Pasteur Institute
Saint-Petersburg, Russia*

The specificity and sensitivity of the method for detecting the hepatitis B virus at low viral load

The specificity and analytical sensitivity of the developed method for detecting HBV DNA at low viral load in blood plasma using hybridization-fluorescence detection in “real time” mode have been analyzed. The sensitivity of the method for DNA extraction from 100 µl of plasma is 10 IU / ml. The method can be used for screening in various risk groups.

Key words: hepatitis B virus, HBV, occult hepatitis B, hepatitis B.

Вирус гепатита В (ВГВ) является одним из восьми известных онкогенных вирусов человека и ответственен за один из самых высоких ежегодных показателей смертности. По данным ВОЗ, количество инфицированных ВГВ в мире составляет около 2 млрд. человек, у 300 миллионов из них развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ) [1].

Наиболее распространенным диагностическим маркером ГВ является поверхностный антиген ВГВ – HBsAg. Однако диагностика HBsAg-негативной (occultной, скрытой) формы инфекции принципиально невозможна с применением иммунологических методов, поскольку определяется наличием кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) в гепатоцитах при отсутствии HBsAg в периферической крови. При HBsAg-негативной форме заболевания сохраняется инфекционность, что способствует распространению ГВ в случае доноров крови и при трансплантации печени, а также риски, связанные с онкогенными свойствами вируса, что может быть особенно опасно в связи с невозможностью своевременного выявления вируса [2].

В настоящее время широко применяются молекулярно-биологические методы, однако ДНК ВГВ в периферической крови, как правило, присутствует в низких концентрациях, что может осложнять

детекцию вируса с использованием стандартных методик, в связи с чем рекомендуется применение высокочувствительных молекулярных методов, таких как гнездовая ПЦР. Вместе с тем, требуются высокоспецифичные методики выявления как минимум двух участков генома вируса для подтверждения обнаружения оккультного хронического гепатита В (окГВ) [3].

Ранее был разработан метод выявления ккзДНК в клетках печени, однако такой инвазивный метод не может применяться для мониторинга в группах риска, что послужило причиной для дальнейшей работы по созданию высокочувствительного метода выявления ДНК ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с электрофоретической детекцией [4], но, ввиду необходимости для его применения соответствующей приборной базы и квалификации специалистов, дальнейшие разработки велись в направлении детекции в режиме «реального времени».

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы является оценка специфичности и аналитической чувствительности разрабатываемого метода выявления ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке в плазме крови с использованием гибридизационно-флуоресцентной детекции в режиме «реального времени».

Метод основан на двухэтапной ПЦР с регистрацией флуоресцентного сигнала по двум каналам: по каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации участка ДНК ВГВ S-региона, по каналу, соответствующему флуорофору ROX – участка ДНК ВГВ X-региона.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), ДНК ВГВ выявляли с использованием набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно рекомендациям производителя, а также разработанной в ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ ЭМ имени Пастера» лабораторной методики, основанной на гнездовой ПЦР с электрофоретической детекцией (чувствительность 10 МЕ/мл) [4]. Для исключения контаминации выявленные случаи были подтверждены секвенированием нуклеотидных последовательностей (ABI PRISM 3500, Applied Biosystems, США).

Для оценки специфичности применяли два подхода – «слепой» анализ пула предварительно охарактеризованных с использованием коммерческих тест-систем ВГВ-позитивных и ВГВ-негативных образцов плазмы крови, а также исследование образцов ДНК/кДНК вируса гепатита А, вируса гепатита С, вируса гепатита D, вируса гепатита Е, вируса гепатита G, вируса иммунодефицита человека, вируса

Эпштейна-Барр, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, вируса герпеса 6 и 8 типов, парвовируса В19, вируса клещевого энцефалита.

Были проанализированы 434 образца плазмы крови пациентов гемодиализного центра, а также условно-здоровых лиц, проживающих в Социалистической Республике Вьетнам. В обследованных группах ДНК ВГВ выявили в 1/1 и 107/107 как HBsAg-позитивных, так и HBsAg-негативных случаях, в обозначенных выше подгруппах соответственно. В пулах, содержащих геномную ДНК/кДНК вируса гепатита А, вируса гепатита С, вируса гепатита D, вируса гепатита Е, вируса гепатита G, вируса иммунодефицита человека, вируса Эпштейна-Барр, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, вируса герпеса 6 и 8 типов, парвовируса В19, вируса клещевого энцефалита, неспецифических реакций выявлено не было. Таким образом, сравнительный анализ специфичности метода выявления ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке в плазме крови с использованием гибридизационно-флуоресцентной детекции в режиме «реального времени» показал его высокую специфичность.

Проверку аналитической чувствительности проводили с помощью последовательных двукратных разведений. Каждый из отобранных для анализа 10 образцов с различной вирусной нагрузкой разводили ВГВ-негативной плазмой крови (число итераций=10). Далее осуществляли экстракцию ДНК, полученные препараты тотальной ДНК амплифицировали согласно предложенному методу.

При концентрации вирусных частиц 10МЕ/мл и более, полученной указанным методом разведений, и выделении ДНК из 100 мкл плазмы крови сигнал был детектирован по обоим каналам. В случае вирусной нагрузки менее 10МЕ/мл пороговый уровень Ct может быть достигнут только для одного из флуорофоров (FAM или ROX). В таком случае рекомендуется повторное выделение ДНК из увеличенного объема биологического материала и повторная постановка ПЦР. Таким образом, аналитическая чувствительность разрабатываемого метода составила 10 МЕ/мл при выделении ДНК из 100мкл плазмы крови.

Разработанный метод является высокоспецифичным и может быть использован при скринировании пациентов различных групп риска – пациентов, направленных на госпитализацию в плановом порядке, иммигрантов, медицинских работников, ВИЧ-инфицированных, доноров крови и др.

Список литературы

1. Jefferies M. et al. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies //World journal of clinical cases. 2018. Т. 6. №. 13. С. 589.
2. Raimondo G. et al. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection //Journal of hepatology. 2019. Т. 71. №. 2. С. 397-408.
3. Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J. Hepatol. 2008; 49: 652–7.
4. Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян А. А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке //Клиническая лабораторная диагностика. 2019. Т. 64. №. 10. С. 635-640.

УДК 612.616:577.112]:612.111.1.015.348].08

Соснин Д.Ю., Галькович К.Р., Кривцов А.В.
ФГБОУ ВО «ПГМУ им академика Е. А. Вагнера»
Минздрава России, Пермь
sosnin_dm@mail.ru

Особенности протеома семенной плазмы и сыворотки крови

Продемонстрированы выраженные различия содержания белка, связывающего жирные кислоты (FABP), моноцитарного хемотаксического фактора (MCP-1), васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) между семенной плазмой и сывороткой крови. Концентрация указанных протеинов в семенной плазме кратко превышала ($p < 0,001$) их содержание в сыворотке крови.

Ключевые слова: белок, связывающий жирные кислоты; FABP; моноцитарный хемотаксический фактор; MCP-1; васкулоэндотелиальный фактор роста; VEGF; семенная плазма; эякулят.

Sosnin D. Yu., Gal'kovich K. R., Krivtsov A. V.
E. A. Vagner Perm State Medical University,
Perm

Features of the proteome of seminal plasma and blood serum

Significant differences in the content of Fatty Acid Binding Protein (FABP), Fatty Acid Binding Protein 1 (MCP-1), and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) between seminal plasma and blood serum were demonstrated.

The concentration of these proteins in seminal plasma was multiple ($p < 0,001$) higher than their content in blood serum.

Key words: *Fatty Acid Binding Protein; FABP; Monocyte Chemoattractant Protein 1; MCP-1; Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF; seminal plasma.*

Новым и перспективным направлением является исследование не только протеома плазмы человека, но и анализ индивидуальных белков различных биологических жидкостей организма человека. Изучение их концентрации в секретах различных органов и биологических жидкостях человека позволяет точнее охарактеризовать их функцию, а также выявить вероятное клинико-диагностическое значение их определения [1,7].

В практике лабораторий широко используется исследование концентрации таких протеинов как белок, связывающий жирные кислоты (БСЖК, *англ. FABP*) [10], моноцитарный хемотаксический фактор (*англ. MCP-1*) [12] и васкулоэндотелиальный фактор роста (ВЭФР, *англ. VEGF*) [5]. Однако в литературе имеется лишь ограниченное число публикаций, посвященных оценке нормальной концентрации этих белков в семенной плазме здоровых мужчин [2,3,4,6,8,9].

Цель исследования. Изучить сравнительную концентрацию FABP, MCP-1, VEGF в семенной плазме и в сыворотке крови у здоровых мужчин.

Материалы и методы. В исследование включены мужчины ($n=24$) репродуктивного возраста, обратившиеся в медицинские учреждения г. Перми по поводу диагностики и лечения бесплодного брака, у которых исследовались сыворотка крови и сперма [11]. Эякулят мужчин, включенных в настоящую работу, характеризовался нормальными параметрами концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов. Критериями исключения являлась повышенная вязкость эякулята (более 20 мм по тесту отрыва нити) [11].

Анализ эякулята выполняли в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения с использованием анализатора эякулята спермы SQA-V («MES», Израиль) [11]. Изучались образцы семенной плазмы и сыворотки крови, оставшиеся в клинико-диагностической лаборатории, после выполнения всех запланированных исследований. Семенную плазму и сыворотку крови отделяли путем центрифугирования на центрифуге при 3000 об/минуту в течение 15-20 минут. Аликвоты биологического материала переносили в пробирки типа Эппендорф и хранили до исследования при температуре -40°C .

Концентрацию FABP, MCP-1, VEGF определяли методом твердо-фазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реактивов «БСЖК – ИФА – БЕСТ», «MCP-1 – ИФА – БЕСТ» «VEGF – ИФА – БЕСТ» (ЗАО Вектор-Бест, Россия). Оптическую плотность проб измеряли на планшетном иммуноферментном анализаторе Stat Fax 4300® (Chromate) (Awarenes, USA).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA v. 7 (StatSoft Inc., США). Для сравнения концентрации FABP, MCP-1, VEGF в парных образцах сыворотки крови и семенной плазмы использовали критерий Вилкоксона. За максимально приемлемую вероятность ошибки первого рода (p) принимали величину уровня статистической значимости равную или меньшую $0,05$.

Результаты и их обсуждение. У всех обследованных во всех образцах семенной плазмы и сыворотки крови были обнаружены FABP, MCP-1, VEGF (табл. 1). В отношении трёх представленных белков наблюдается одна и та же закономерность – содержание указанных протеинов в семенной плазме значительно выше, чем в сыворотке крови.

Таблица 1. Концентрация FABP, MCP-1, VEGF в сыворотке крови и семенной плазме обследованных

	FABP, нг/мл	MCP-1, пг/мл	VEGF, пг/мл
Сыворотка крови (n=24)	0,28 (0,16–0,42)	122,6 (96,4–139,9)	143 (102,5–270)
Семенная плазма (n=24)	1,37 (1,28–1,60)	2232,6 (1813,4–2825,8)	3423 (3283,5–3497,5)
p (критерий Вилкоксона)	$p=0,000001$	$p=0,000018$	$p=0,000018$

Примечание: в таблице представлены медиана и интерквартильный диапазон (Ме и 25% квартиль; 75% квартиль)

Медиана концентрации FABP в семенной плазме превышала таковую в сыворотке крови в 4,9 раз. Ещё более выраженные различия отмечены в отношении MCP-1 и VEGF: медиана концентрации MCP-1 в семенной плазме превосходила соответствующее значение в сыворотке крови в 18,2; VEGF – в 23,9 раз.

Вместе с тем для других факторов роста и цитокинов различия могут отсутствовать. Так в публикации *Pilatz et al., (2017)* не зарегистрирована статистически значимая разница в содержании гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (*англ. GM-SCF*) и интерлейкина-2 (*англ. IL-2*) между сывороткой крови и семенной плазмой (табл. 2) [8].

Таблица 2. Концентрация GM-SCF и IL-2 в сыворотке крови и семенной плазме (цит. по *Pilatz et al., 2017*)

	GM-SCF, пг/мл	IL-2, пг/мл
Сыворотка крови	0,00 (0,00–0,26)	0,00 (0,00–9,15)
Семенная плазма	0,66 (0,00–1,68)	0,00 (0,00–4,34)
p (критерий Вилкоксона)	p>0,05	p>0,05

Примечание: в таблице представлены медиана и интерквартильный диапазон (Me и 25% квартиль; 75% квартиль)

Вероятны два основных механизма, ведущих к поступлению изученных белков в сперму. Первый – пассивное проникновение из крови через гистогематические барьеры, и второй – активная секреция этих белков железами и клетками, участвующими в формировании спермы.

Необычно высокая концентрация изученных белков в семенной плазме указывает на то, что наиболее вероятным механизмом появления данных протеинов в сперме является их активная секреция клетками и железами, формирующими эякулят. Таким образом, особенность протеома семенной плазмы выражается в присутствии в ней отдельных компонентов протеома сыворотки крови как вкратно превосходящих концентрациях, так и в содержании по уровню, достоверно не различающимся в двух указанных биологических средах. Вероятно, высокий уровень некоторых белков обусловлен их участием в процессах репродукции.

Список литературы

1. Алейник В.А., Бабич С.М., Ходжиматов Г.М., Ибрагимов С.Р., Шокирова С.М. Влияние улиностатина на иммунные свойства и протеолитическую активность спермы у мужчин с нарушением фертильности // *Re-health journal*. 2019. №2. С. 11-21.

2. Галькович К.Р., Соснин Д.Ю. Моноцитарный хемотаксический фактор и фертильность эякулята // Сборник тезисов юбилейной междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием, посвященной юбилею городского центра эндоскопической урологии и новых технологий «Нам 10 лет» (25–26 октября 2019 г.). Санкт-Петербург, 2019. С. 55.

3. Соснин Д.Ю., Галькович К.Р. Васкулоэндотелиальный фактор роста и фертильность эякулята // Лабораторная служба. 2020. Т. 9, №1. С. 84–89. doi: 10.17116/labs2020901184

4. Соснин Д. Ю., Галькович К. Р., Зубарева Н. А., Кривцов А. В., Поздин Н. В. Белок, связывающий жирные кислоты, в сыворотке крови и сперме // Урология. 2019. №3. С.95-100. doi: 10.18565/urology.2019.3.95-100

5. El Baba N, Farran M, Khalil EA, Jaafar L, Fakhoury I, El-Sibai M. The Role of Rho GTPases in VEGF Signaling in Cancer Cells // Anal Cell Pathol (Amst). 2020. 2097214. doi: 10.1155/2020/2097214.

6. Jamshidi J., Pouresmaeili F., Darvish H., Omrani D., Azargashb E., Sadeghi M.R., Lakpour N. FABP9 Mutations Are Not Detected in Cases of Infertility due to Sperm Morphological Defects in Iranian Men // Int J Fertil Steril. 2014. V. 7, № 4. Pp. 275-280.

7. Martínez HR, Escamilla-Ocañas CE, Camara-Lemarroy CR, González-Garza MT, Moreno-Cuevas J, García Sarreón MA. Increased cerebrospinal fluid levels of cytokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β) in patients with amyotrophic lateral sclerosis // Neurologia. 2020. V. 35, № 3. Pp. 165-169. doi: 10.1016/j.nrl.2017.07.020.

8. Pilatz A, Hudemann C, Wolf J, Halefeld I, Paradowska-Dogan A, Schuppe HC, Hossain H, Jiang Q, Schultheiss D, Renz H, Weidner W, Wagenlehner F, Linn T. Metabolic syndrome and the seminal cytokine network in morbidly obese males // Andrology. 2017. V. 5, № 1. Pp. 23-30. doi: 10.1111/andr.12296.

9. Rametse C. L., Adefuye A. O., Oliver A. J., Curru L., Gamielidien H., Burgers W. A., Levis D. A., Williamson A.L., Katz A.A., Passmore J. Inflammatory cytokine profiles of semen influence cytokine responses of cervicovaginal epithelial cells // Front Immunol. 2018. №9. Pp. 2721. doi: 10.3389/fimmu.2018.02721

10. Rezar R, Jirak P, Gschwandtner M, Derler R, Felder TK, Haslinger M, Kopp K, Seelmaier C, Granitz C, Hoppe UC, Lichtenauer M. Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein (H-FABP) and its Role as a Biomarker in Heart Failure: What Do We Know So Far? // J Clin Med. 2020. V. 9, № 1. Pp. 164. doi: 10.3390/jcm9010164.

11. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf?sequence=1 (ссылка активна на 15.08.2020).

12. Zhang W, Zhu T, Chen L, Luo W, Chao J. MCP-1 mediates ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis via MCP1P1 and CaSR // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020. V. 318, №1. H59-H71. doi: 10.1152/ajpheart.00308.2019.

УДК 616-006

Сырвакова А.О.

*ФГАОУ ВО Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского
Медицинская академия имени С.И. Георгиевского,
Симферополь
syrvakova.angelina@yandex.ru*

Диагностические перспективы пониженной регуляции микроРНК при колоректальном раке

На данный момент не найдено специфических биомаркеров для диагностики колоректального рака. Было обнаружено, что микроРНК, подавляющая трансляцию и запускающая деградацию мРНК, при колоректальном раке находится на уровне, отклоняющемся от нормы. Данный обзор описывает потенциальную возможность использования микроРНК в диагностике колоректального рака.

Ключевые слова: биомаркер, колоректальный рак, диагностика, микроРНК.

Syrvakova A.O.

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University
Medical Academy named after S.I. Georgievsky
Simferopol*

Diagnostic perspectives of downregulation of microRNA in the colorectal cancer

At the moment, specific biomarkers have not been found for the diagnosis of colorectal cancer. It was found that miRNA, which suppresses translation and triggers the degradation of mRNA, show aberrant levels in the colorectal cancer. This review describes the potential use of miRNA in the diagnosis of colorectal cancer.

Key words: biomarkers, colorectal cancer, diagnosis, miRNA.

Нарушение регуляции микроРНК наблюдается практически во всех типах злокачественных новообразований. Приблизительно 50% изменений локализируются в ассоциированных с раком геномных областях или хрупких участках, приводя клетки к атипии [8]. В опухолевых тканях наблюдается пониженная экспрессии микроРНК-217 по сравнению со здоровыми, что может служить отличительной чертой в диагностике злокачественных новообразований [15]. Подобного рода маркеры обнаруживают во многих биологических жидкостях организма, таких как бронхиальная слизь, семенная жидкость, слезы, грудное молоко, амниотической, спинномозговой, плевральной или перитонеальной жидкостях [29]. МикроРНК противостоят деградации, взаимодействуя с белком плазмы и перемещаясь в экзосомах, микровезикулах или апоптогических телах [3].

Несмотря на то, что колоректальный рак (КРР) является одним из самых распространенных видов рака во всем мире [19], отсутствуют достоверные биомаркеры, облегчающие диагностику и последующее лечение. При КРР наблюдается инактивация генов-супрессоров опухолей и активация онкогенной сигнализации, амплификации или мутации локусов микроРНК. МикроРНК влияют на биологию раковых недифференцированных клеток, ангиогенез, эпителиально-мезенхимальные и мезенхимально-эпителиальные переходы и лекарственную устойчивость [24]. Недифференцированные клетки рака толстой кишки могут переключаться между раковыми дифференцированными и недифференцированными клетками, являясь причиной резистентности к химиотерапии [6]. Исследования секвенирования микроРНК в отношении КРР определили специфические профили экспрессии, связанные с клинико-патологическим прогнозом [23]. Хамффорд и др. [8] идентифицировали 19 низкорегулируемых и 18 высокорегулируемых микроРНК при КРР. Были определены пять наиболее экспрессируемых микроРНК (микроРНК-10a-5p, -21-5p, -22-3p, -143-3p и -192-5p) внутри пула из 523 микроРНК из 88 образцов КРР [21]. МикроРНК-143-3p и микроРНК-192-5p являются частью кластеров, связанных с онкогенами, генами репарации ДНК и генами сигнальных путей WNT и MAPK. МикроРНК-221 ингибирует активность ангиогенеза; микроРНК-29a связана с остановкой клеточного цикла; микроРНК-21 приводит к инициации опухоли, увеличивая инвазию и метастазирование; а микроРНК-26b связана с ростом раковых клеток [23].

Значительное число микроРНК проявляют дифференциальную экспрессию в тканях КРР с пониженной регуляцией микроРНК, что особенно важно для клеточной пролиферации, апоптоза и метастазирования.

МикроРНК 16-1 удалена или является низкорегулируемой во многих линиях раковых клеток. Она транскрибируется с помощью микроРНК 15а/16-1 и влияет на процесс эпителиально-мезенхимального перехода, способствуя метастазированию клеток КРР [25]. Р53 активирует микроРНК-15а/16-1, ингибирующей экспрессию AP4, транскрипционного фактора, опосредующего эпителиально-мезенхимальный переход; это приводит к репрессии метастазов в легком – наиболее частого последствия КРР [22]. Образцы тканей 90 пациентов с КРР коррелировали как с более низкой экспрессией микроРНК 15а и микроРНК 16-1, так и с большим количеством IgA+ В-клеток, а также с худшей выживаемостью пациентов. Было обнаружено, что мышиная модель первичного колоректального рака с дефицитом микроРНК 15а и микроРНК 16-1 способствует накоплению IgA-позитивных иммуносупрессивных В-клеток (IgA+В) в опухолевых тканях, что коррелировало с более быстрым ростом опухоли [14].

Эктопическая экспрессия микроРНК 15а / 16-1 увеличивает количество клеток фазы G2/М в клеточных линиях КРР, уменьшая образование клеточных колоний. Уровни белка циклин В1 имеют обратную корреляцию с уровнями микроРНК 15а/16-1, что означает, что циклин В1 является мишенью этих микроРНК [5]. Циклин Е1 содержит два участка-мишени микроРНК 16-1. Однако исследование показало неравномерное увеличение соотношения микроРНК 16-1 к количеству ингибируемой мишени циклин Е1 в сторону увеличения количества микроРНК 16-1, тем самым указывая на существование других мишеней микроРНК 16-1 [26]. МикроРНК 16-1 имеет обратную корреляцию по отношению к циклооксигеназе-2 (ЦОГ-2), избыточная экспрессия которой является критическим этапом опухолевого процесса КРР [4]. В здоровых клетках микроРНК 16-1 может связываться с мишенями ЦОГ-2 и опосредовать ее распад; однако в опухолевых клетках этот механизм ингибируется, позволяя повысить уровень ЦОГ-2 [30].

Кластер микроРНК-143/микроРНК-145 является опухолевым супрессором, заметно сниженным в метастатических опухолях КРР [28]; его мишени включают ингибитор апоптоза 5, K-RAS, ERK5 и субстрат 1 инсулинового рецептора. Профиль метилирования кластера микроРНК-143/микроРНК-145 после химиолучевой терапии демонстрирует значительное нарушение регуляции этих микроРНК в тканях. Наблюдается снижение экспрессии микроРНК-145 в тканях КРР в 4-5 раз по сравнению со здоровыми тканями толстой кишки [11]. Кроме того, сверхэкспрессия микроРНК-145 снижает миграционную способность клеток КРР, что указывает на возможность подавления миграции клеток КРР и отдаленной инвазии.

МикроРНК-145 ингибирует рост опухоли, что сопровождается повышенным апоптозом и сниженной пролиферацией. Анализ 16 профилей экспрессии микроРНК у 40 пациентов с рецидивирующим и нерезидивирующим КРР, показывает снижение экспрессии микроРНК-145, что свидетельствует о ее способности служить надежным биомаркером для раннего выявления этой патологии [17].

МикроРНК-34 а, в и с – это три члена семейства микроРНК с одинаковыми мишенями, регулирующие р53 и гиперметилированием ДНК. Их эктопическая экспрессия индуцирует старение, апоптоз и ингибирование инвазии опухолевых клеток [23], в то время как потеря экспрессии вызывает резистентность к р53-индуцированному апоптозу. Дерегулированное семейство микроРНК-34 связывают с возможностью прогнозирования КРР. В тканях КРР обнаруживают снижение регуляции микроРНК-34а, в то время как его экспрессия положительно коррелирует с выживаемостью; увеличение микроРНК-34б/с связывают с неблагоприятным прогнозом [9].

Эктопическая экспрессия микроРНК-34 подавляет инвазию, рост клеток и активность р53 в клетках. Такие же результаты были получены в ходе опытов с клетками ксенотрансплантата, что делает экспрессию прогностическим маркером рецидива КРР. Исследование стресс-индуцированного клеточного апоптоза, возникающего в результате сверхэкспрессии р53-зависимой микроРНК-34, показало повышение устойчивости клеток КРР к апоптозу [7]. При сравнении экспрессии микроРНК-34 в тканях КРР с экспрессией в нормальных тканях слизистой оболочки толстой кишки, семейство микроРНК-34 в первом случае оказалось снижено [18]. Кроме того, клетки КРР, обработанные ингибитором метилтрансферазы, демонстрируют снижение уровня микроРНК-34, связанного с гиперметилированием промотора, в то время как исследования *in vitro* с дифторированным куркумином, индуцированным повторно экспрессируемой микроРНК-34, показывают однонаправленность с ингибированием роста опухолевых клеток.

МикроРНК-137 часто ингибируется метилированием. Такое ингибирование используется в клеточных линиях КРР, демонстрирующих деметилирование и повышенную регуляцию микроРНК-137, что предполагает подавление промотора метилированием. Восстановление уровня микроРНК-137 снижает пролиферацию клеток, что предполагает опухолевую супрессию. В клетках КРР была обнаружена обратная корреляция между микроРНК-137 и лизин-специфической деметилазой 1А, участвующей в поддержании глобального метилирования ДНК [27]. Пониженная регуляция микроРНК-137 в

клетках КРР вызывает сверхэкспрессию гена паксиллина (PXN). PXN кодирует фокальную молекулу адгезии [20], тем самым обуславливая больший размер опухоли, неблагоприятный статус дифференцировки, более обширную инвазию лимфатических узлов, более высокую стадию TNM, плохую общую выживаемость, менее благоприятный прогноз, большую пролиферативную способность и более высокую колониобразующую способность; аналогично это происходит с форминоподобным белком 2 (FMNL2), мишенью микроРНК-137. FMNL2 стимулирует пролиферацию, подвижность, инвазию клеток КРР и метастазирование в естественных условиях путем индукции эпителиально-мезенхимального перехода. Эктопическая экспрессия микроРНК-137 ингибирует эффекты FMNL2, что приводит к снижению пролиферации и инвазии клетками КРР, а также метастазированию в печень и кишечник [12].

Эктопическая микроРНК-143 в клетках КРР снижает экспрессию ДНК-метилтрансфераз 3А и снижает рост клеток, фенотипы злокачественной трансформации и эффективность клонообразования. МикроРНК-143 является независимым негативным прогностическим фактором для специфической выживаемости рака у пациентов с КРР [16]. МикроРНК-143 понижает регуляцию белков: протеинкиназы 5 и ядерного фактора-кВ, дополнительно снижающихся после экспозиции 5-фторурацила, вызывая снижение жизнеспособности и повышенную гибель клеток.

МикроРНК КРР экспрессируются в различных тканях и являются потенциальными биомаркерами. Анализ концентрации микроРНК-21 и микроРНК-92а в сыворотке крови пациентов с КРР, обнаружив более высокие уровни по сравнению со здоровыми испытуемыми. Обычно высокий уровень микроРНК-21 обнаруживается в плазме крови онкологических больных [13]. Низкие уровни микроРНК-150 могут помочь отличить пациентов с прогрессирующим КРР от пациентов с аденомами [1]. Недавно микроРНК-1290 была предложена в качестве нового биомаркера для раннего выявления КРР. Кроме того, плазменные панели могут быть использованы для быстрой идентификации полипов при исследовании концентрации микроРНК (микроРНК-532-3р, -331, -195, -17, -142-3р, -15b, -532 и -562) или КРР стадии IV (микроРНК-431, -15b и -139-3р) [10]. Был разработан чип для анализа микроРНК-9, -29b, -127-5р, -138, -143, -146а, -222 и -938, служащий в качестве основы для изучения прогрессирования заболевания с использованием образцов крови [2].

Несмотря на все полученные данные, остается ряд проблем: существует дефицит клинической информации, плохой выбор контролей,

этническая принадлежность является потенциальной смешивающей переменной, а небольшой размер экспериментальных групп не позволяет экстраполировать их на клиническую практику.

Список литературы

1. Aherne S. Circulating miRNAs miR-34a and miR-150 associated with CRC progression // *BMC Cancer*. 2015. Vol. 15. P. 329.
2. Ahmed F. miRNA as markers for the diagnostic screening of colon cancer // *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014. Vol. 14. P. 463-485.
3. Chen X. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // *Cell Res*. 2008. Vol. 18. P. 997-1006.
4. Cheng H. Control of cyclooxygenase-2 expression and tumorigenesis by endogenous 5-methoxytryptophan // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. Vol. 109. P. 13231-13236.
5. Dai L. Vector-based miR-15a/16-1 plasmid inhibits colon cancer growth in vivo // *Cell Biol Int*. 2012. Vol. 36. P. 765-770.
6. Fesler A. Overcoming chemoresistance in cancer stem cells with the help of microRNAs in colorectal cancer // *Epigenomics*. 2017. Vol. 9. P. 793-796.
7. Ge P. Aberrant methylation of the 1p36 tumor suppressor gene RIZ1 in renal cell carcinoma // *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015. Vol. 16. P. 4071-4075.
8. Hamfjord J. Differential expression of miRNAs in CRC: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing // *PLoS One*. 2012. Vol. 7(4).
9. Hiyoshi Y. Increased microRNA-34b and -34c predominantly expressed in stromal tissues is associated with poor prognosis in human colon cancer. // *PLoS One*. 2015. Vol. 10.
10. Kanaan Z. A plasma microRNA panel for detection of colorectal adenomas: a step toward more precise screening for colorectal cancer // *Ann Surg*, 2013. Vol. 258. P. 400-408.
11. Li C. Inhibition of SW620 human colon cancer cells by upregulating miRNA-145 // *World J Gastroenterol*. 2016. Vol. 22. P. 2771-2778.
12. Liang L. MicroRNA-137, an HMGA1 target, suppresses CRC cell invasion and metastasis in mice by directly targeting FMNL2 // *Gastroenterology*. 2013. Vol. 144. P. 624-635.
13. Liu G. Serum miR-21 and miR-92a as biomarkers in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer // *Tumour Biol*. 2013. Vol. 34. P. 2175-2181.

14. Liu R. MicroRNAs 15A and 16-1 activate signaling pathways that mediate chemotaxis of immune regulatory B cells to CRC // *Gastroenter.* 2018. Vol. 154. P. 637-651.
15. Lu J. MicroRNA expression profiles classify human cancers // *Nature.* 2005. Vol. 435. P. 834-838.
16. Pichler M. Down-regulation of KRAS-interacting miRNA-143 predicts poor prognosis but not response to EGFR-targeted agents in CRC // *Br J Cancer.* 2012. Vol. 106. P. 1826-1832.
17. Roy P. Engineered andrographolide nanosystems for smart recovery in hepatotoxic conditions // *Int J Nanomedicine.* 2014. Vol. 9. P. 4723-4735.
18. Roy S. Expression of miR-34 is lost in colon cancer which can be re-expressed by a novel agent // *CDF J Hematol Oncol.* 2012. Vol. 5. P. 58.
19. Siegel R. Cancer statistics // *CA Cancer J Clin.* 2016. Vol. 66. P. 7-30.
20. Schaller M. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein // *Oncogene.* 2001. Vol. 20. P. 6459-6472.
21. Schee K. Deep sequencing the microRNA transcriptome in colorectal cancer // *PLoS One.* 2013. Vol. 8.
22. Shi L. p53-induced miR-15a/16-1 and AP4 form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transition and metastasis in CRC // *Cancer Res.* 2014. Vol. 74. P. 532-542.
23. Stiegelbauer V. MicroRNAs as novel predictive biomarkers and therapeutic targets in colorectal cancer // *World J Gastroenterol.* 2014. Vol. 20. P. 11727-11735.
24. Tarasov V. Coordinated aberrant expression of miRNAs in CRC // *Genetika.* 2014. Vol. 50. P. 1232-1244.
25. Thiery J. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease // *Cell.* 2009. Vol. 139. P. 871-890.
26. Wang F. Down-regulation of the cyclin E1 oncogene expression by microRNA-16-1 induces cell cycle arrest in human cancer cells // *BMB Rep.* 2009. Vol. 42 (11). P. 725-730.
27. Wang J. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation // *Nat Genet.* 2009. Vol. 41. P. 125-129.
28. Wang W. Epigenetically regulated miR-145 suppresses colon cancer invasion and metastasis by targeting LASP1 // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7. P. 68674-68687.
29. Weber J. The microRNA spectrum in 12 body fluids // *Clin Chem.* 2010. Vol. 56. P. 1733-1741.
30. Young L. The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of COX-2 // *Mol Cancer Res.* 2012. Vol. 10. P. 167-180.

Сырвакова А.О.
ФГАОУ ВО Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского
Медицинская академия имени С.И. Георгиевского,
Симферополь
syrvakova.angelina@yandex.ru

Комплексная диагностика злокачественных новообразований

Современные методы диагностики злокачественных новообразований, такие как лабораторная диагностика, радиология и патология, являются разделенными областями. Значительный прогресс в диагностике порождает междисциплинарные конвергенции, выражающиеся в комплексной диагностике. Мы рассмотрим комплексную диагностику, как медицинскую область, обладающую огромным потенциалом для революционизации диагностики и терапевтического лечения злокачественных новообразований.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, патология, диагностика, радиология, лабораторная медицина.

Syrvakova A.O.
V.I. Vernadsky Crimean Federal University
Medical Academy named after S.I. Georgievsky,
Simferopol

Integrated diagnostics of cancer

Modern diagnostic methods of cancer such as laboratory diagnostics, radiology and pathology are separate disciplines. The substantial progresses in diagnostics are now generating important multidisciplinary convergences, called integrated diagnostics. This review describes integrated diagnostic as a discipline with enormous potential for revolutionizing diagnosis and therapeutic management of cancer.

Key words: cancer, pathology, diagnosis, radiology, laboratory medicine.

Согласно последним статистическим данным ВОЗ смерть по причине злокачественных новообразований составляет 15,8% от всех смертей. Согласно прогнозам, число смертей по этой причине будет линейно увеличиваться в ближайшие 40 лет и практически удвоится к 2060 году [1,2]. Поэтому для обсуждения текущего сценария и будущих

перспектив комплексной диагностики мы возьмем злокачественные новообразования, по-прежнему создающие наибольшую клиническую, социальную и экономическую нагрузку на человечество.

Патология остается главенствующей дисциплиной в диагностике злокачественных новообразований на протяжении десятилетий, поскольку она является практически единственной отраслью диагностической медицины, способной выявить злокачественное заболевание и определить тип рака, стадию и даже потенциальную терапевтическую уязвимость [3].

Развитие нашего понимания биологии злокачественной патологии (например, открытие генетических мутаций и эпигенетических детерминант, управляющих ростом злокачественных новообразований) в сочетании с заметными техническими достижениями значительно изменили роль патологов в последние годы, открыв путь к развитию относительно инновационных областей диагностики, а именно молекулярной диагностики и геномного профилирования. Диагностическая визуализация также играет важную роль в лечении злокачественных патологий, поскольку она участвует в первичной диагностике, а затем способствует наблюдению, контролю и терапевтическому мониторингу [4].

Третья ключевая диагностическая отрасль — лабораторная медицина, также глубоко вовлечена в диагностику злокачественных новообразований. Ее нынешний вклад является минимальным для диагностики, по крайней мере, по сравнению с предусмотренными вкладами патологии и радиологии. Лабораторная медицина сводится к оценке узкого ряда биомаркеров, таких как Простатспецифического антигена (ПСА) для скрининга рака предстательной железы, вируса папилломы человека (ВПЧ) для скрининга рака шейки матки, теста на скрытую кровь в кале для скрининга колоректального рака [5-7]. Подавляющее большинство других молекулярных или фенотипических биомаркеров, которые могут быть измерены в обычных клинических лабораториях, используются с другой целью — для мониторинга заболеваний и принятия прогностических и терапевтических решений [8].

В отличие от других патологий, комплексная диагностика уже является реальностью в диагностике злокачественных новообразований, при этом почти каждое руководство или рекомендация включает в себя дискретное количество лабораторных, патологических и радиологических исследований [9].

Цифровая патология и крупномасштабный вычислительный анализ также активно развиваются. Предварительные данные показы-

вают, что их сочетание с радиомикой (извлечением большого числа признаков из рентгенографических изображений с использованием алгоритмов характеристики данных) позволит значительно продвигаться в диагностической и прогностической точности [10].

Аналогичная «молекулярная революция», которая затронула патологию и лишь незначительно радиологию, теперь глубоко вовлекает лабораторную медицину [11]. Анализ aberrантных путей на молекулярном уровне больше не ограничивается образцами тканей, полученных с помощью инвазивных процедур. Теперь подобный анализ может быть проведен с образцами крови и других биологических жидкостей, полученных с помощью гораздо менее инвазивной венопункции. Термин «жидкая биопсия» (liquid biopsy) точно определен Национальным институтом рака США (NCI) как «тест, выполняемый на образце крови для поиска раковых клеток из опухоли, циркулирующих в крови, или кусочков ДНК из опухолевых клеток, находящихся в крови» [12]. По мнению NCI, жидкая биопсия может быть использована для раннего выявления злокачественной патологии, определения наиболее подходящей терапии, мониторинга терапевтического ответа и раннего выявления злокачественного рецидива. Следовательно, будущие стратегии принятия решений должны опираться на тканевые и кровяные биомаркеры, а также передовые технологии визуализации, например, МРТ, сцинтиграфию или ПЭТ [13]. Полученная комбинация сигнатур крови, цифровой патологии и радиомики является наиболее эффективным подходом для более точной диагностики, характеристики и лечения рака в ближайшем будущем. Биологически ориентированная интервенционная радиология и тераностика открывают большие перспективы для выявления подгруппы онкологических больных, которые с большей вероятностью будут реагировать на целенаправленную химиотерапию [9].

В заключение следует отметить, что комплексная диагностика может рассматриваться как одна из самых больших возможностей для будущего здравоохранения, поскольку она позволит оказывать более ориентированную на пациента помощь, получать лучшие результаты и в конечном итоге снижать затраты с течением времени. Возможность объединения различных диагностических методов в рамках единой медицинской карты также будет способствовать развитию баз данных популяционного уровня, содержащих агрегированную информацию о миллионах пациентов, что позволит получить более целостную картину многих заболеваний человека и разработать более эффективное лечение. Поэтому необходимо приложить допол-

нительные усилия для развития сотрудничества между различными диагностическими дисциплинами, преодолевая культурные, политические и технические границы, для развития диагностической дисциплины будущего.

Список литературы

1. Projections of mortality and causes of death, 2016 to 2060 / World Health Organization (WHO). [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/. (дата обращения 19.07.2020).
2. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2016. Geneva / World Health Organization (WHO). 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html. (дата обращения 20,07.2020).
3. Ahmed A.A. Cancer diagnostics: The journey from histomorphology to molecular profiling // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. P. 696–708.
4. Shinagare A.B. Evidence-Based Cancer Imaging // *Korean J Radiol*. 2017. Vol. 18. P. 8–12.
5. Filella X. Prostate cancer screening: guidelines review and laboratory issues // *Clin Chem Lab Med*. 2019. Vol. 57. P. 74–87.
6. Kroupis C. Human papilloma virus (HPV) molecular diagnostics // *Clin Chem Lab Med*. 2011. Vol. 49. P. 83–99.
7. Young B.R. A systematic review of U.S.-based colorectal cancer screening uptake intervention systematic reviews: Available evidence and lessons learned for research and practice // *Front Public Health*. 2019. Vol. 7. P. 145.
8. Montagnana M. Cancer diagnostics: current concepts and future perspectives // *Ann Transl Med*. 2017. Vol. 5. P. 268.
9. Kalia M. Personalized oncology: recent advances and future challenges // *Metabolism*. 2013. Vol. 62 P. 1–4.
10. Gillies R.J. Radiomics: images are more than pictures, they are data // *Radiology*. 2016. Vol. 278. P. 63–77.
11. Giannopoulou L. Liquid biopsy in ovarian cancer: recent advances on circulating tumor cells and circulating tumor DNA // *Clin Chem Lab Med*. 2018. Vol. 56. P. 86–97.
12. Liquid biopsy / US National Cancer Institute. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/liquid-biopsy>. (дата обращения 01.08.2020).
13. Madabhushi A. Integrated diagnostics: a conceptual framework with examples // *Clin Chem Lab Med*. 2010. Vol. 48. P. 89–98.

УДК 578.2+578.5+578.7+ 578.828.6

Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Семенов А.В.
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера,
Санкт-Петербург
tvildorm@gmail.com, shenna1@yandex.ru, ezueva79@mail.ru,
alexvsemenov@gmail.com

**Разработка метода выявления клинически значимых мутаций
вируса иммунодефицита человека с использованием таргетного
массированного параллельного севенирования**

В настоящее время широко используется секвенирование методом Сэнгера для анализа ВИЧ на наличие мутаций лекарственной устойчивости, с его помощью анализируют небольшие по протяженности участки генома ВИЧ. В рамках данной работы мы планируем апробировать метод секвенирования нового поколения SBS для более глубокого исследования последовательности генома вирусы и выявления большего количества устойчивых мутантов.

Ключевые слова: ВИЧ, мутации лекарственной устойчивости, NGS, SBS.

Schemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Semenov A.V.
FBSI Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after
Pasteur,
St. Petersburg

**Development of a method for detecting clinically significant mutations of
the human immunodeficiency virus using targeted massive parallel seeding
sequencing**

In currently widely used sequencing method of Sanger assay for HIV drug resistance mutations, it can analyze a small length of portions of the HIV genome. As part of this work, we plan to test a new generation SBS sequencing method for a deeper study of the viral genome sequence and identification of more resistant mutants.

Key words: HIV, drug resistance mutations, NGS, SBS.

По Данным ВОЗ на конец 2019 года в мире проживало 38 миллионов человек с ВИЧ инфекцией [1]. В России на конец октября 2019 года проживали 1 060 553 человека по предварительным данным Федерального научно-методического Центра по профилактике и борьбе со СПИДом [2].

Эффективное использование АРВП позволяет не только сохранить, но и значительно улучшить качество жизни пациентов с ВИЧ-инфекцией, а также является профилактическим фактором, так как в результате ВААРТ снижается вирусная нагрузка и падает вероятность передачи вируса половым путем. Однако повсеместное использование АРВП связано с развитием устойчивости вируса к антиретровирусным препаратам, что приводит к неудачной терапии.

Современные анализы для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 основаны на популяционном секвенировании генов протеазы (pro) и обратной транскриптазы ВИЧ-1 или на выявлении специфических точечных мутаций в обратной транскриптазе ВИЧ-1, связанной с резистентностью [3].

Популяционное генотипирование остается текущим клиническим стандартом для оценки мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ (ЛУ ВИЧ) у лиц, имеющих сероконверсию при использовании PrEP, для лиц, начинающих АРТ (первичной или переданной резистентности), и для людей, не получающих схемы АРТ. Стандартные анализы генотипирования имеют высокую стоимость на образец (> 150 долларов США)[3,6], требуют высоких минимальных вирусных нагрузок (1000 копий / мл), имеют ограниченный охват генами (до 335 кодона в гене обратной транскриптазы ВИЧ-1), в разной степени успешны при генотипировании HIV-1 не В-подтипов, и выявляет только резистентные варианты, которые составляют более 20% популяции вируса в выборке. [6,7] В нескольких внутренних анализах сообщалось об улучшении производительности для секвенирования не подтипа В ВИЧ-1, и они значительно снизили стоимость по сравнению с коммерческими анализами (примерно до 50–150 долларов США), но эти методы остаются трудоемкими с большим объемом ручной работы и недостаточной масштабируемостью [7].

NGS обладает потенциалом для адаптации к высокопроизводительному недорогому анализу на ВИЧ-инфекцию с низкочастотным обнаружением мутаций на уровне 1–5% от всей популяции. Чтобы NGS была готова к внедрению для эпиднадзора за ВИЧ, необходимы улучшения в процедурах анализа и обработки данных, а также апробация метода в различных условиях [5, 8].

Улучшения в ПЦР и NGS приведут к более высокой пропускной способности для анализа интактного провируса. ДНК-полимеразы с улучшенной процессорной способностью и корректурой (3'-5'-экзонуклеазная активность) позволяют амплифицировать почти полноразмерные ампликоны, но при использовании множественных реакций секвенирования Сэнгера имеют ограниченную пропуск-

ную способность. Последние платформы NGS (например, Pacific Bio-Sciences, Menlo Park, Калифорния, США) улучшили длину считывания шаблонов, что позволяет секвенировать геномы целого ВИЧ [6].

Целью исследования является апробирование методов NGS для таргетного секвенирования и последующего генотипирования ВИЧ и выявления клинически значимых мутаций в геноме вируса.

Материалы и методы исследования. Для исследования использовалась плазма от пациентов с установленной неэффективностью АРВТ, поступившая для исследования в Северо-Западный Окружной Центр СПИД.

Результаты и их обсуждение. На основе анализа генома ВИЧ, а также изучения данных литературы были выбраны достаточно консервативные участки гена *pol*, фланкирующие фрагмент гена, включающий все известные точки клинически значимых мутаций. На основе этих участков были сгенерированы последовательности праймеров, подходящих для амплификации целевого фрагмента.

Выделенную РНК из плазмы подвергали ОТ, а затем двухраундной ПЦР. Эффективность реакции оценивалась с помощью горизонтального гель-электрофореза. Из образцов, успешно проходивших амплификацию, были подготовлены библиотеки для последующего SBS-секвенирования на приборе MiSeq. По результатам секвенирования 59% всех найденных мутаций присутствовали на частотах между 2% и 20% популяции вируса внутри хозяина и, вероятно, были бы пропущены традиционными методами генотипирования на основе Сэнгера.

Заключение. Разработанный метод обладает потенциалом для адаптации к высокопроизводительному анализу на ВИЧ-инфекцию с низкочастотным обнаружением мутаций на уровне 1–5% от всей популяции. Чтобы данный подход был готов к внедрению, необходимы улучшения в процедурах анализа и обработки данных, а также апробация метода в различных условиях.

Список литературы

1. Global Health Observatory (GHO) data. HIV/AIDS
URL: <https://www.who.int/gho/hiv/en/>
2. В.В. Покровский, Н.Н. Ладная, Е.В. Соколова, Е.В. Буравцова. ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ. Информационный бюллетень № 44 / М.: Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. 2019 г. 56 с.
3. Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. PLoS One. 2012; 7(2):e30087

4. Ekici H, Rao SD, Sönnnerborg A, Ramprasad VL, Gupta R, Neogi U, J Cost-efficient HIV-1 drug resistance surveillance using multiplexed high-throughput amplicon sequencing: implications for use in low- and middle-income countries. *Antimicrob Chemother.* 2014 Dec; 69(12):3349-55.
5. Casadella M, Paredes R. Deep sequencing for HIV-1 clinical management. *Virus Res* 2016
6. Hiener B., Eden J.S., Horsburgh B.A., Palmer S. Amplification of Near Full-length HIV-1 Proviruses for Next-Generation Sequencing. *J Vis Exp.* 2018 Oct 16;(140).
7. Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Tully DC, et al. Use of dried blood spots to elucidate full-length transmitted/founder HIV-1 genomes. *Pathog Immun* 2016; 1:129–153.
8. Urvi M. Parikh, Kevin McCormick, Gert van Zyl, and John W. Mellors. Future technologies for monitoring HIV drug resistance and cure. *Curr Opin HIV AIDS.* 2017 Mar; 12(2): 182–189.

УДК 57.088.7

*Эль-Диб Ахмед А.¹, Заблоцкая С. С.¹, Рубель М.С.¹,
Комиссаров А.Б.², Колпашников Д.М.^{1,3}
Международный научный центр SCAMT
(Растворной химии и передовых материалов и технологий)¹,
Университет ИТМО
Лаборатория молекулярной вирусологии
НИИ Гриппа им. А.А. Смородинцева²
Химический факультет,
Университет Центральной Флориды в Орландо³
Санкт-Петербург
eldeeb@scamt-itmo.ru, zablotskaya@scamt-itmo.ru,
rubel@scamt-itmo.ru, kolpashchikov@scamt-itmo.ru*

ДНК-машина для определения nCOV-SARS-2019

Несмотря на дороговизну оборудования, q-PCR доминирует в диагностике вирусных инфекций благодаря высокой скорости и точности. В данном исследовании рассмотрен альтернативный подход к обнаружению nCOV-SARS-2019 с помощью ДНК-наномашин, производящих флуоресцентный сигнал в присутствии участка нуклеиновой кислоты. Данный метод позволит снизить стоимость диагностических процессов и упростить их.

Ключевые слова: наномашина, дезоксирибозим, ДНКзим, COVID, коронавирус, обнаружение, диагностика, руки.

*El-Deeb Ahmed A.¹, Zablotskaya S. S.¹, Rubel M.S.¹,
Komissarov A.B.², Kolpashchikov D.M.^{a,c}
SCAMT institute (Solution Chemistry of Advanced
Materials and Technologies)¹,
ITMO University lab molecular virology,
Smorodintsev research Institute of Influenza²
Chemistry Department,
University of Central Florida Orlando³
Saint-Petersburg*

DNA diagnostic machine for nCOV-SARS-2019 recognition

Despite the high cost of equipment and reagents, q-PCR-based test dominates in diagnosis of the viral infections due to high speed and accuracy. In this study, we explored an alternative approach for nCOV-SARS-2019 detection using DNA nano-machines producing fluorescent signal in the presence of specific nucleic acid analyte. This method can simplify and reduce the cost of diagnostic test.

Key words: *DNA, machine, deoxyribozyme, DNA nanotechnology, COVID, point of care diagnostics, fluorescent sensors, folded RNA.*

Введение. Вирусы, которые содержат рибонуклеиновую кислоту, склонны к мутациям, что зачастую приводит к значительному осложнению симптомов заболевания [1]. Обнаружение вирусов на ранних этапах после заражения всегда было ключевым моментом на пути к быстрому и безопасному выздоровлению [2]. Однако данная задача является весьма проблематичной ввиду своей высокой стоимости и сложности процесса диагностирования [3]. Новое поколение дезоксирибозимов – наномашин являются альтернативным подходом к решению данной проблемы, который может значительно упростить процесс обнаружения вируса и, как следствие, будет иметь заметно меньшую стоимость [4]. За последние несколько лет ДНКзимы показали весьма многообещающее развитие и успешные результаты испытаний, начиная от разработки зонда и заканчивая бинарным ДНКзимом, который состоит из двух цепей, содержащих распознающие олигонуклеотидные фрагменты («руки»), которые, в свою очередь, прикрепляются к последовательности нуклеиновой кислоты. Таким образом, формируется каталитический центр и, когда «руки» прикреплены к аналиту, происходит расщепление флуоресцентного субстрата, как показано на рис. 1. Также ДНКзимы могут применять-

ся и для коротких последовательностей, которые не всегда образуют прочные вторичные структуры [5,6].

В данном исследовании рассмотрены ДНК наномашин, которые имеют 4 «руки», удерживаемые вместе двухцепочечным каркасом. Вместе 4 «руки» кооперативно раскручивают вторичную структуру РНК анализита вокруг анализируемого участка РНК или ДНК [4]. Разработанная ДНК машина относится к классу бинарных сенсоров и содержит каталитический центр ДНКзима 10–23, образующийся при обнаружении необходимого фрагмента.

Выбранная из генома nCOV-19 последовательность содержит полиморфизм в области 15431 – 15446 нуклеотидов, GTGAAATGGTCATGTG, который является частью гена *RdRp* [7].

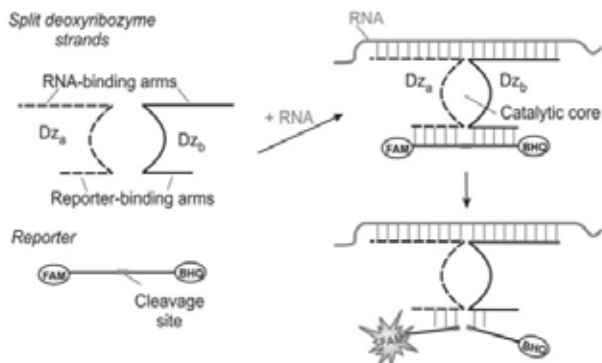


Рис. 1. Схема основного принципа работы системы ViDz [4]. Две нити ДНК *Dz_a* и *Dz_b* гибридизуются с совместимым участком анализита РНК и образуют каталитический центр, который расщепляет флуорофор и квинчер гашения флуоресценции (ВНQ1)

Данная последовательность комплементарна первой руке, у которой температура плавления ниже по сравнению с другими руками, что делает ее более чувствительной к мутациям. Руки 3 и 4 способствуют физическому раскручиванию вторичных структур, которые могут образовываться в вирусной РНК, рис. 2.

Методы и материалы исследования.

1. Флуоресцентный анализ

А. Синтетическая ДНК

Образцы, содержащие 200 нМ Ф-субстрат, были добавлены в буфер А (50 мМ MgCl₂, 50 мМ HEPES, 150 мМ KCl и 15 мМ NaCl). Для сборки наномашин были соединены 20 нМ отдельной руки 1 и 5 нМ T1 (рука 2), которая была отождествлена с T2 (руки 3 и 4). Для осуществ-

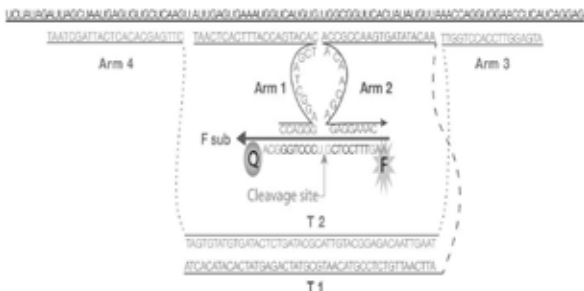


Рис. 2. Наномашина для обнаружения pCOV. Данная машина состоит из отдельной руки 1, покрывающей область ОНП, и остальных рук 2, 3, 4, которые соединены при помощи T1 и T2

вления отжига между T1 и T2 олигонуклеотиды были помещены в кипящую воду и впоследствии оставлены на сутки для постепенного снижения температуры (рис. 3).

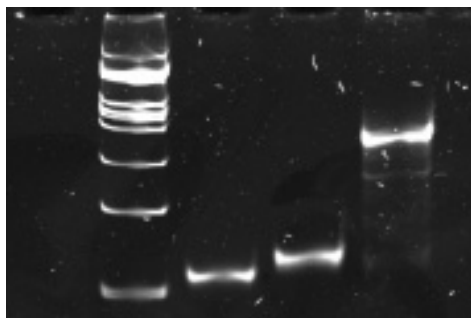


Рис. 3. Наномашины после сборки и отжига. Ячейка 1 – T1 (рука 2), Ячейка 2 – T2 (руки 3 и 4), Ячейка 3 – отоженные T1 и T2. Анализ в полиакриламидном геле. Слева маркер веса 100-1000

Для расчета предела обнаружения наномашин образцы инкубировали в течение 1 и 3 часов при постоянной температуре 55 °С, также были использованы различные концентрации синтетической ДНК, постепенно уменьшающиеся от значения 50 пМ до 0,1 пМ, со следующими промежуточными концентрациями: 20 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 2 пМ, 1 пМ, 0,5 пМ, как показано на рис. 5.

Далее был определен предел обнаружения с помощью формулы 1.

$$\text{Формула 1: } 3 \sigma_b \leq R - b \quad (1) [8]$$

В. РНК анализ

РНК была получена из клинических образцов, которые были выделены в институте Гриппа. Следуя схеме, описанной выше, был проведен флуоресцентный анализ, в котором использовали РНК вместо ДНК. РНК добавляли в реакцию в различных количествах.

Предварительные результаты и обсуждение.

Тестирование наномашины на обнаружение синтетической ДНК. Образцы анализировали после первого и третьего часов инкубирования при помощи спектрофотометра Infinite 200, TECAN, Германия. Данное исследование показало, что после 3 часов наблюдалось сильное флуоресцентное излучение при высокой концентрации аналита, составляющей 50 пМ, которое постепенно уменьшалось со снижением концентрации. Таким образом, было выявлено, что наименьшей концентрацией, превышающей предел обнаружения, является 5 пМ, рис. 4.

В результате тестирования наномашины на синтетической ДНК было обнаружено, что минимальной концентрацией, которая может быть обнаружена, является 5 пМ

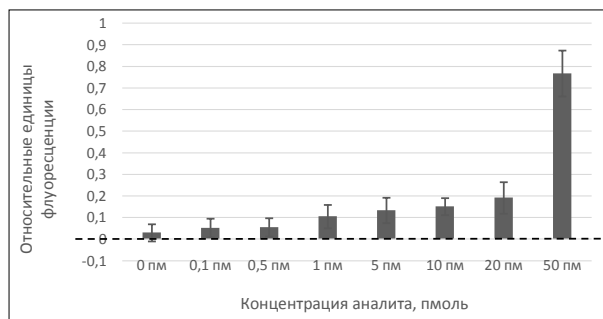


Рис. 4. Расчет предела обнаружения

Тестирование наномашины на обнаружение РНК. Вирусная РНК из клинических образцов с положительной n-COV нуклеиновой кислотой была обнаружена с помощью q-PCR. Образцы были добавлены к реакции в различных количествах, а затем проанализированы с использованием того же спектрофотометра. Данное исследование показало более сильный отклик наномашины, что продемонстрировано на рис. 5, с использованием более высоких количеств добавленных образцов.

Выводы и следующие этапы исследования. ДНК-наномашина показала свою эффективность в использовании с синтезированными участками аналита. Чувствительность ДНК наномашины увеличивается с введением дополнительного объема клинического аналита. Для того чтобы в будущем иметь возможность использовать данный

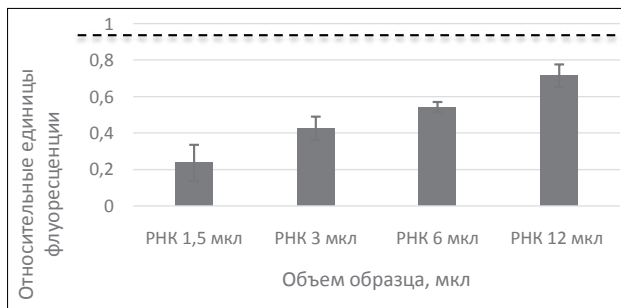


Рис. 5. Флуоресцентный анализ с РНК образцами

подход для клинического материала следует провести дополнительные исследования:

1. Проведение большего числа испытаний с вирусной РНК и расчет предела обнаружения в клинических образцах.
2. Проведение тестов с РНК вируса, выделенного из заражённых клеточных структур.
3. Увеличение чувствительности наномашинны.

Список литературы

1. Sanjuán R., Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation // Cellular and Molecular Life Sciences. 2016. № 23 (73). С. 4433–4448.
2. Afsahi S. [и др.]. Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection // Biosensors and Bioelectronics. 2018. (100). С. 85–88.
3. Dorlass E. G. [и др.]. Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR // Brazilian Journal of Microbiology. 2020. № 3 (51). С. 1117–1123.
4. Gerasimova Y. V. [и др.]. Expedited quantification of mutant ribosomal RNA by binary deoxyribozyme (BiDz) sensors // RNA (New York, N.Y.). 2015. № 10 (21). С. 1834–1843.
5. Gerasimova Y. V., Cornett E., Kolpashchikov D. M. RNA-Cleaving Deoxyribozyme Sensor for Nucleic Acid Analysis: The Limit of Detection // ChemBioChem. 2010. № 6 (11). С. 811–817.
6. Kolpashchikov D. M. Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots // Accounts of Chemical Research. 2019. № 7 (52). С. 1949–1956.
7. Corman V. M. [и др.]. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR // Eurosurveillance. 2020. № 3 (25).
8. MacDougall D., Crummett W. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry 1980.

**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 1

Технический редактор *Т.Н. Ефимова*

Подписано в печать 30.11.2020 г.
Формат бумаги 60×84/16. Уч.-изд. л. 16,95. Усл. печ. л. 21,15.
Тираж 50 экз. Заказ № 230(1).

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.