



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
4-й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ
ХИМИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ»,
ПОСВЯЩЕННОЙ
135-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ
ПРОФЕССОРА В. В. ЛЕБЕДИНСКОГО**

7–8 декабря 2023 г.

Часть 1



**Санкт-Петербург
2023**



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
4-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ**

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

**ПОСВЯЩЕННОЙ 135-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ
ПРОФЕССОРА В. В. ЛЕБЕДИНСКОГО**

**Санкт-Петербург
7–8 декабря 2023 года**

Под редакцией Л. Б. Гайковой, Н. В. Бакулиной

Часть 1

**Санкт-Петербург
2023**

УДК 54+57+61
ББК 24.28.5
С56

Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов 4-й Международной конференции, посвященной 135-летию со дня рождения профессора В.В. Лебединского. 7–8 декабря 2023 года / под ред. Л.Б. Гайковой, Н.В. Бакулиной. Ч. 1. — СПб.: Изд-во ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, 2023. — 264 с.

ISBN 978-5-89588-450-8
Ч. 1 978-5-89588-451-5

Редакционная коллегия: д.м.н., доцент, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики биологической и общей химии им. В.В. Соколовского *Гайковая Л.Б.*; д.м.н., профессор *Глушков С.И.*; к.п.н., доцент *Иванова И.С.*; к.х.н., доцент *Попов А.С.*

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, и других заинтересованных лиц.

Материалы публикуются в авторской редакции.

УДК 54+57+61
ББК 24.28.5

ISBN 978-5-89588-450-8
Ч. 1 978-5-89588-451-5

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.
- Инновационные технологии в клинической лабораторной диагностике.
- Современные достижения в доклинических и клинических исследованиях.
- Проблемы теории и практики химико-биологического образования в медицинском вузе.

© ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Гайковая Л.Б.</i> ВРАЧИ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СО ЗНАНИЯМИ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОХИМИИ И АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ КАК РЕЗУЛЬТАТ ОБУЧЕНИЯ НА КАФЕДРЕ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ, БИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОБЩЕЙ ХИМИИ им. В.В. СОКОЛОВСКОГО.....	10
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ХИМИИ ПРИРОДНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, А ТАКЖЕ ПРИМЕНЕНИЕ ХИМИИ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ	15
<i>Абдуллина М.И., Горобец М.Г., Мотякин М.В., Майорова О.А., Лопухова М.В., Каспаров В.В., Бычкова А.В.</i> ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В АНАЛИЗЕ ЦЕЛОСТНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ ПОКРЫТИЙ ИЗ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ.....	15
<i>Ахмедов Т.Р., Чулков А.В., Вафина А.Б.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ПСИЛОЦИНА КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОЙ ХИМИИ	19
<i>Беляев А.П., Беляева С.А.</i> СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КОМПЕТЕНТНОСТИ АНАЛИТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ.....	28
<i>Борищук А.Р.</i> СИНТЕЗ НОВЫХ АЦЕТАНИЛИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1-МЕТИЛХИНАЗОЛИН-2,4(1Н,3Н)-ДИОНА	38
<i>Васильева П.А., Дмитриева И.Б.</i> ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ НА ПРОЦЕСС НАБУХАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ	42
<i>Вергун О.М.</i> МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРАКТИКЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	48

<i>Горобец М.Г., Бычкова А.В., Абдуллина М.И., Мотякин М.В.</i>	
ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ КРОВИ НА ПЕРОКСИДАЗОПОДОБНЫЕ СВОЙСТВА МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ	55
<i>Дадали В.А., Соколова Е.А., Степанова Н.П., Антонова Ж.В., Быкова Д.И.</i>	
ТРОПАНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ ФИЗАЛИСА СЕМЕЙСТВА ПАСЛЕНОВЫХ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ.....	61
<i>Дикарева Е.О., Иванова И.С., Попов А.С.</i>	
ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШАМПУНЕЙ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ	69
<i>Зорина Т.Е., Кравченко И.Е., Коблов И.В., Баран Л.В., Бисвоз С., Зорин В.П.</i>	
НАНОРАЗМЕРНЫЕ МИЦЕЛЛЫ ИЗ СОПОЛИМЕРОВ — ПОЛУЧЕНИЕ, СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ.....	76
<i>Колесникова Т.С., Уфлянд И.Е.</i>	
НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИРИДОКСИНА ГИДРОХЛОРИДА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ...	84
<i>Ланцова Е.А.</i>	
ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРОУПРАВЛЯЮЩЕГО АГЕНТА НА ВРЕМЯ ОБРАЗОВАНИЯ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО ГИБРИДНОГО АНТИСЕПТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	90
<i>Лебедева Е.Я., Косман В.М., Карлина М.В., Дадали Ю.В.</i>	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЭТСХ В БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ: ЗА И ПРОТИВ.....	95
<i>Лебединская К.С., Крымская Т.П., Чеботкова Д.В.</i>	
ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ОКИСИ ЭТИЛЕНА В ВОДНЫХ ВЫТЯЖКАХ ИЗ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, СТЕРИЛИЗОВАННЫХ ОКИСЬЮ ЭТИЛЕНА.....	102
<i>Мисник Е.В., Эльдиб А.А., Колпащиков Д.М.</i>	
ГИБЕЛЬ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ	109

<i>Никанорова И.Е., Цыганкова Е.П., Башар М.Ю.</i> КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКТИВНЫХ ИНДИКАТОРНЫХ БУМАГ, ИМПРЕГНИРОВАННЫХ МЕТИЛОВЫМ ОРАНЖЕВЫМ	113
<i>Попов А.С., Иванова И.С.</i> МНОГОВАРИАНТНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНО- ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ КАК СЛЕДСТВИЕ ОТСУТСТВИЯ ОГРАНИЧЕНИЙ НА УСЛОВИЯ ИХ ПРОТЕКАНИЯ	117
<i>Сибирцев В.С., Зайцева А.Ю., Пономарев Н.Д., Передкова В.Е.</i> МУЛЬТИСЕНСОРНАЯ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКАЯ СИСТЕМА АНАЛИЗА СЛОЖНЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СМЕСЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКО- И НИЗКОСЕЛЕКТИВНОГО ЖЕЛЕЗНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ	125
<i>Фандо Г.П.</i> СИНТЕЗ СЕКОСТЕРОИДОВ ЭСТРАНОВОГО РЯДА	129
<i>Шерстнев В.В., Чухно А.С., Сучкова К.М., Тухватуллина Е.Р., Романенко М.С., Радин М.А.</i> СИНТЕЗ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ АЛЬБУМИНОВЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ	134
<i>Широкова И.Ю., Кучук В.И., Радин М.А., Демина Е.В., Коледенко Д.В., Малков С.Д., Зарифи К.О.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ПОЛЯРИМЕТРИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ИБУПРОФЕНА	142
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ	148
<i>Алаидини Л. Н., Брюханова Н. Д., Вольхина И.В.</i> ЗНАЧЕНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-7 В РАЗВИТИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ	148
<i>Александрова Л.А., Рейпольская Т.Ю., Субботина Т.Ф., Жлоба А.А.</i> ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАТИОНА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК НА РАННИХ СТАДИЯХ В СОЧЕТАНИИ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ	153

<i>Вохмянина Н.В., Соколова М.Н., Зверева А.Р., Харина А.Ю.</i>	
СЕЛЕН И АУТОИММУННЫЙ ТИРЕОИДИТ	159
<i>Галкина А.Д., Парменова Е.О., Вольхина И.В.</i>	
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПОРТЕРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ В МЕДИЦИНЕ.....	166
<i>Голованова Н.Э., Басанько А.В., Астратенкова И.В., Лукьянова И.Ю.</i>	
СОЧЕТАНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ADRB1 И SOD2 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО- СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	173
<i>Деркач К.В., Басова Н.Е., Шпаков А.О.</i>	
ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ МЕТФОРМИНА С РАЗЛИЧНЫМИ ДОЗАМИ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ИНСУЛИНА НА ГЛЮКОЗНЫЙ ГОМЕОСТАЗ И ИНСУЛИНОВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА	177
<i>Захаров А.С., Василовский И.Н., Нозадзе Н.Д., Короткова Н.В., Мжаванадзе Н.Д.</i>	
РАЗРАБОТКА ПЕРОКСИНИТРИТ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ БИОПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	183
<i>Зорина И.И., Захарова И.О., Шпаков А.О.</i>	
ЭФФЕКТЫ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ИНСУЛИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КОРЕ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ГЛОБАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ	190
<i>Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д.</i>	
ОЦЕНКА СВЯЗИ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ L-СЕЛЕКТИНА И УРОВНЕМ NO-СИНТАЗ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРИФЕРИЧЕСКИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ.....	196
<i>Краецкая О.Ф.</i>	
ПРОГНОЗИРОВАНИЕ IN SILICO ИНГИБИТОРНЫХ СВОЙСТВ ПИОГЛИТАЗОНА В ОТНОШЕНИИ NDAC1 И NDAC2.....	201
<i>Кутузова Е.Г., Хабибрахманов А.И.</i>	
БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ ОЖИРЕНИЯ	205
<i>Муста Оглы Н.М., Жилинская Н.Т., Бландов А.Н., Чуглова К.П.</i>	
ВЫСОКОАКТИВНАЯ АНТИРЕТРОВИРУСНАЯ ТЕРАПИЯ....	208

<i>Муста Оглы Н.М., Жилинская Н.Т., Бландов А.Н.</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КАЛУСНЫХ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ МОРКОВИ	211
<i>Попов А.С., Иванова И.С., Крылова Л.С., Стручков Д.А.</i> БИОХИМИЯ СЛЮНЫ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАК ПОКАЗАТЕЛИ СТРЕССА ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННОГО КОФЕИНОМ.....	219
<i>Соболева Н.Г., Ланда С.Б., Шалгуев В.И., Обухова И.А., Юнг И.А., Филатов М.В.</i> БЕЛКИ ПО-РАЗНОМУ УСТОЙЧИВЫ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИМПУЛЬСА	225
<i>Теплых К.А., Вольхина И.В.</i> BDNF И ИШЕМИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	233
<i>Тимохина Д.Д., Жерегеля С.Н., Глушков С.И.</i> РОЛЬ РААС В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК, ВЫЗВАННОГО СЕПСИСОМ.....	237
<i>Торопцева А.В., Горобец М.Г., Бычкова А.В., Градова М.А., Колотаев А.В., Хачатрян Д.С.</i> ПОЛУЧЕНИЕ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ПОКРЫТИЕМ ИЗ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТОЙ	244
<i>Халиков К.М., Саттарова Х.Г., Очилова Н.У.</i> СОЗДАНИЕ НОВОГО МЕТОДА ЛЕЧЕНИЯ КОЖНОГО ЛЕЙШМАНИОЗА	250
<i>Циммер И.А., Гордеев К.В., Погуляй Ю.А., Галенко-Ярошевский П.А., Доценко В.В.</i> МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ПРОИЗВОДНЫХ N-АЦЕТИЛИРОВАННЫХ 5-АМИНО-1,2,4-ТРИАЗОЛОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ XIII	256
<i>Чельшева Л.А., Нониашвили Е.М., Паткин Е.Л.</i> БИСФЕНОЛ А ПРИВОДИТ К ОБЩЕГЕНОМНОМУ УМЕНЬШЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ H3K27me2-МАРКЕРА ТРАНСКРИПЦИОННО НЕАКТИВНОГО ХРОМАТИНА В ЯДРАХ БЛАСТОМЕРОВ 2-КЛЕТОЧНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШЕЙ IN VITRO	262

Уважаемые коллеги!

Мы рады встрече! Перед вами сборник научных трудов 4-й Международной научно-практической конференции «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине», посвященной 135-летию со дня рождения профессора Лебединского В.В.

Эта конференция особенная в связи с тем, что она организована вновь созданной 01 апреля 2023 года кафедрой по приказу ректора ФГБОУ ВО Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова Минздрава России д.м.н., профессора С.А. Сайганова — кафедрой клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии им. В. В. Соколовского.

Несмотря на то, что конференция проводится уже четвертый год, мы сохраняем ее традиционную форму проведения и структуру сборника научных статей, в то же время вносим изменения. Так, в этом году конференция посвящена 135-летию со дня рождения Вячеслава Васильевича Лебединского (1888–1956), который с 1931 по 1936 г. заведовал кафедрой неорганической, аналитической и физической химии 2-го ЛМИ. Лебединский В. В. начинал свою деятельность на кафедре в 1915 г. в должности ассистента. Он, как опытный педагог, придавал большое значение вопросам учебно-методического характера, разрабатывал учебные пособия для студентов. В.В. Лебединский — химик, профессор (1931), член-корреспондент АН СССР (1946), лауреат Сталинской премии (1946), заслуженный деятель науки и техники РСФСР (1947). Большая часть его работ носила секретный характер. Он занимался изучением химии комплексных соединений платины, родия, иридия и других металлов.

Сборник научных трудов состоит из разделов, посвященных актуальным вопросам биологической и медицинской химии, современным достижениям в доклинических исследованиях, инновационным технологиям в клинической лабораторной диагностике, а

также проблемам и новым методам преподавания в медицинском вузе.

Темы и вопросы, обсуждаемые на конференции, а также статьи, представленные в сборнике, будут полезны как студентам, обучающимся в медицинских вузах, клиническим ординаторам, так и аспирантам, молодым ученым, научным сотрудникам, преподавателям химии и биохимии, а также специалистам в различных областях знаний.

Пожелаю всем интересно провести время при ознакомлении с материалами сборника научных трудов!

*С уважением, д.м.н., доцент
заведующий кафедрой клинической лабораторной
диагностики, биологической и общей
химии им. В.В. Соколовского
Гайковая Лариса Борисовна*

УДК 37.08

Гайковая Л.Б.
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург
Larisa.Gaikovaya@szgmu.ru

**ВРАЧИ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
СО ЗНАНИЯМИ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОХИМИИ И
АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ КАК РЕЗУЛЬТАТ ОБУЧЕНИЯ НА
КАФЕДРЕ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ,
БИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОБЩЕЙ ХИМИИ ИМ. В.В. СОКОЛОВСКОГО**

В статье представлена необходимость и возможности подготовки врачей по специальности «клиническая лабораторная диагностика» на кафедре клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии им. В.В. Соколовского.

Ключевые слова: подготовка специалистов, лабораторная медицина, клиническая химия, биохимия.

Gaikovaya L.B.
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg

**DOCTORS OF CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS WITH
KNOWLEDGE OF FUNDAMENTAL BIOCHEMISTRY AND
ANALYTICAL CHEMISTRY BECAUSE OF TRAINING AT THE
DEPARTMENT OF CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS,
BIOLOGICAL AND GENERAL CHEMISTRY NAMED AFTER
V.V. SOKOLOVSKY**

The article presents the need and possibilities for training doctors in the specialty «clinical laboratory diagnostics» at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Biological and General Chemistry named after. V.V. Sokolovsky.

Keywords: training of specialists, laboratory medicine, clinical chemistry, biochemistry.

В последние годы в области лабораторной медицины произошли глобальные изменения, которые связаны с высокими технологиями и пандемией COVID-19. Оборудование, которым были в этот период оснащены клинико-диагностические лаборатории, заменило многие ручные методы и требует дополнительных знаний в области технологии проведения лабораторного исследова-

ния. Технологическая сложность современного лабораторного оборудования, знания по контролю качества лабораторных исследований, правил преаналитического и аналитического этапов проведения анализов определяют актуальность преподавания таких необходимых дисциплин, как медицинская химия и фундаментальная биохимия. Подготовка будущих врачей по специальности «клиническая лабораторная диагностика», а большинство обучающихся в ординатуре являются выпускниками медико-профилактического факультета, заключается в необходимости сформировать у них целостные знания по аналитической и биологической химии, показать связь химических процессов и биологических систем организма человека, как будущему специалисту лабораторной медицины.

В настоящее время у врачей разных специальностей и студентов знания в области «клинической лабораторной диагностики» достаточно отрывочны, бывают и противоречивы, так как получены в процессе обучения на разных не профильных клинической лабораторной диагностике кафедрах [1]. У врачей отсутствуют представления о чувствительности и специфичности лабораторных тестов и правильности выбора теста в необходимой клинической ситуации.

Таким образом, все выше перечисленное является основанием для создания образовательной траектории обучения на кафедре, которая может обеспечить подготовку врачей лабораторной медицины, имеющая подготовленных преподавателей по всем направлениям обучения будущих специалистов лабораторной диагностики — по аналитической химии, клинической биохимии, клинической лабораторной диагностике, а также владеющих современными методами преподавания этих дисциплин. Такая кафедра появилась в 2023 г. путем слияния двух кафедр клинической лабораторной диагностики и биологической и общей химии им. В.В. Соколовского [2]. Каждая кафедра в отдельности имела свои особенности преподавания, высокопрофессиональный профессорско-преподавательский состав, традиции и историю. Объединенная кафедра клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии им. В.В. Соколовского будет готовить специалистов с глубокими знаниями фундаментальных наук по биохимии, имеющих навыки работы на сложном лабораторном оборудовании и умеющих интерпретировать полученные результаты с анализаторов, вести диалог с клиницистами.

Цель. Подготовка специалистов лабораторной медицины с углубленным изучением биологической химии, привлечением методов аналитической химии для исследования маркеров заболеваний или патологических состояний организма на кафедре клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии (КЛД, БиОХ) им. В.В. Соколовского.

Для этой цели на кафедре клинической лабораторной диагностики имеется профессорско-преподавательский состав и вспомогательный персонал, материально-техническое обеспечение и клинические базы для прохождения практики в клинико-диагностических лабораториях.

В настоящее время в штатном расписании кафедры КЛД, БиОХ 28 преподавателей: 6 профессоров, 11 доцентов, 1 старший преподаватель и 10 ассистентов. Из них 5 докторов медицинских наук, 1 доктор химических наук, остальные преподаватели — кандидаты биологических, медицинских, химических и педагогических наук, 3 преподавателя без кандидатских степени. Несколько преподавателей кафедры, являются заведующими крупных клинико-диагностических лабораторий в медицинских организациях Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Резервом кафедры КЛД, БиОХ им. В.В. Соколовского являются 5 заочных аспирантов, которые одновременно работают в клинико-диагностических лабораториях клиник Университета и проходят педагогическую практику на кафедре.

К материально-техническим базам относятся учебные лаборатории в 26 павильоне, в 5 павильоне, а также центральная клинико-диагностическая лаборатория в павильоне 1/3-2 (заведующая ЦКДЛ, д.м.н., профессор Гайковая Л.Б.) (пр. Пискаревский, д.47) и отделение лабораторной диагностики (заведующая ОЛД, к.м.н., доцент Слепышева В.В.) (ул. Кировная, д. 41). Научно-исследовательская работа преподавателей кафедры и аспирантов выполняется на клинических базах и в центральной научно-исследовательской лаборатории в 42 павильоне (заведующая ЦНИЛ, к.м.н., доцент Асатрян Т.Т.).

В результате кафедра КЛД и БиОХ им. В.В. Соколовского преподает на различных уровнях: на додипломном, специалитете, последипломном. Первое знакомство будущих поступающих в вуз по специальностям «Лечебное дело», «Медико-профилактическое дело» и др. с лабораторной диагностикой проходит при посещении центральной клинико-диагностической лаборатории в рамках профориентационной работы ВУЗа. На занятии школьники получают

представление о специальностях медико-профилактического направления, в том числе и о клинической лабораторной диагностике. Во время учебы в Университете для студентов различных факультетов проводятся занятия по различным дисциплинам — химии, биохимии, клинической лабораторной диагностике в рамках программ ФГОС++. Однако студентам, имеющим способности и желание заниматься научными исследованиями, и которые уже определились со своей последипломной специальностью по клинической лабораторной диагностике, кафедра представляет возможность ознакомиться с современными методами и оборудованием, проводить лабораторные работы, дополнительно осваивать различные клинические разделы, необходимые для специалистов лабораторной медицины. На последипломном уровне выпускники Университета могут выбрать ординатуру по «клинической лабораторной диагностике» или аспирантуру по «биохимии» или «клинической лабораторной диагностике».

На последипломном уровне кафедра занимается подготовкой врачей/биологов/младших лабораторных техников на циклах повышения квалификации лабораторных специалистов. Появились новые темы занятий по значимости токсикологических исследований в клинической лабораторной диагностике, по диагностике метаболических нарушений, по диагностике point-of-care-testing для врачей и среднего медперсонала, работающего на лабораторном оборудовании у постели больного в отделениях ОРИТ, применение клинико-экономического анализа в деятельности клинико-диагностических лабораторий [3].

Знания биологической и общей химии являются основой для многих клинических и гигиенических дисциплин, включая раздел клинической биохимии, который входит и в программу подготовки ординаторов по клинической лабораторной диагностике. На базе кафедры в ЦКДЛ, в ОЛД и в ЦНИЛ выполняются диссертационные работы как по биохимии, так и по клинической лабораторной диагностике [4].

Кафедра клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии им. В.В. Соколовского обеспечивает непрерывное химико-биологическое и медицинское образование, предметственность преподавания фундаментальных и специальных дисциплин [5], имеет кадровый состав по различным дисциплинам и материально-техническую базу для педагогического процесса и развития научных исследований студентов и аспирантов, что повышает

не только заинтересованность выпускников медико-профилактического факультета в отношении специальности «Клиническая лабораторная диагностика», но и в общей подготовке специалистов лабораторной медицины.

Список литературы

1. Вавилова Т.В., Сироткина О.В., Черныш Н.Ю., Берестовская В.С., Жиленкова Ю.И., Кухарчик Г.А., Пармон Е.В. Лабораторная медицина в современной практике обучения врачей клинических направлений // Российский кардиологический журнал. 2021. Т. 26(S1). С. 4385. DOI:10.15829/1560-4071-2021-4385

2. Павлова Р.Н., Соколова Е.А., Гайковая Л.Б., Антонова Ж.В. Соколовский Виктор Владимирович — биохимик, токсиколог, гелиобиолог // Биохимия XXI века. Материалы научно-практической конференции с международным участием. 2021. С. 188-195.

3. Гайковая Л.Б., Бурбелло А.Т., Ермаков А.И., Федоренко А.С., Вавилова Т.В., Комок М.В. Клинико-экономический анализ в оценке технологий здравоохранения в лечебно-профилактическом учреждении/Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2014. Т. 7. № 1. С. 8-12.

4. Гайковая Л.Б., Павлова Р.Н., Шалгуев В.И., Соболева Н.Г., Соколова Е.А., Степанова Н.П. О необходимости введения инновационных методов в программу подготовки аспирантов в медицинском университете // В сборнике Инновации в образовании. Материалы XIII международной учебно-методической конференции. 2023. С. 146-151.

5. Иванова И.С., Попов А.С., Гайковая Л.Б. Мастер-класс «химические методы окраски биоматериалов» // Химия в школе. 2023. № 7. С. 55-61.

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

УДК 544.723

*Абдуллина М.И.¹, Горобец М.Г.¹,
Мотякин М.В.^{1,2},
Майорова О.А.³, Лопухова М.В.¹,
Каспаров В.В.¹, Бычкова А.В.¹*

*¹ФГБУН Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва*

*²Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва*

*³ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского»,
Саратов
triyozhika@gmail.com*

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
В АНАЛИЗЕ ЦЕЛОСТНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ
ПОКРЫТИЙ ИЗ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА
НА ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

Была проведена оценка устойчивости и целостности белкового покрытия на поверхности магнитных наночастиц, в различных условиях: при варьировании рН и ионной силы буфера, в котором проводилась инкубация, концентрации ЧСА, время инкубации; при окислительной модификации человеческого сывороточного альбумина (ЧСА); при окислительной модификации поверхности магнитных наночастиц.

***Ключевые слова:** магнитные наночастицы, человеческий сывороточный альбумин, белковая «корона».*

*Abdullina M.I.¹, Gorobets M.G.¹, Motyakin M.V.^{1,2},
Mayorova O.A.³, Lopukhova M.V.¹, Kasparov V.V.¹,
Bychkova A.V.¹*

*¹Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of
Sciences, Moscow*

*²N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian
Academy of Sciences, Moscow*

*³Science Medical Center, Saratov State University,
Saratov*

ANALYSIS OF INTEGRITY AND STABILITY OF SERUM ALBUMIN COATINGS ON THE SURFACE OF MAGNETIC NANOPARTICLES USING PHYSICAL-CHEMICAL METHODS

The stability and integrity of the protein coating on the surface of magnetic nanoparticles was assessed under various conditions: pH and ionic strength of the phosphate buffer in which incubation was carried out; concentration of HSA; incubation time; oxidative modification of human serum albumin (HSA); oxidative modification of the surface of magnetic nanoparticles;

Keywords: *magnetic nanoparticles, human serum albumin, protein «corona».*

В соответствии с результатами исследований последнего десятилетия при введении наноразмерных частиц биомедицинского назначения в кровь на их поверхности может формироваться белковая «корона», напрямую влияющая на их функционирование, продолжительность циркуляции и биораспределение в организме. Формирование короны зависит от многих факторов, включая особенности состава и рельефа поверхности частиц, а также условий протекания реакции [1-4].

Нами проводится разработка способов комплексного исследования сложных систем, включающих магнитные наночастицы (МНЧ) и сывороточный альбумин, который обладает высокими перспективами использования в качестве компонента гибридных наносистем на основе МНЧ. Исследование реализуется с применением неповреждающих методов анализа — спектрофотометрии УФ/видимой области (СФ) и динамического светорассеяния (ДСР), спектрофлуориметрии, метода электронного магнитного резонанса (ЭМР). Ранее было показано, что иммуноглобулин G (IgG) и фибриноген связываются с поверхностью МНЧ, образуя агрегаты микронных размеров, причем человеческий сывороточный альбумин может препятство-

вать образованию таких агрегатов в случае формирования им устойчивого и целостного покрытия на поверхности МНЧ [5].

Взаимодействие человеческого сывороточного альбумина с наночастицами было исследовано в близких к физиологическим условиям в 0,05 М фосфатном буфере. Было установлено, что стабильность белкового адсорбционного слоя на МНЧ снижается с увеличением рН буфера от слабокислого (рН6,0–6,6) до слабощелочного (рН7,5), а также при увеличении ионной силы буфера (рис. 1).

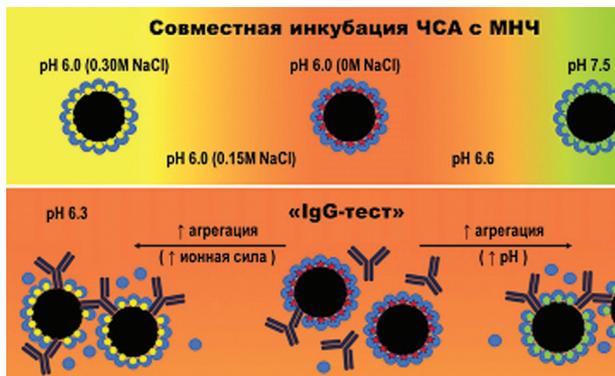


Рис. 1. Схематическое изображение покрытий из сывороточного альбумина человека, сформированных в 0,05 М фосфатном буфере при различных рН и ионной силе, определяемой концентрацией NaCl, а также различной устойчивости покрытий в экспериментах с IgG

Все методы, использованные в процессе оценки устойчивости покрытия из альбумина на наночастицах (СФ, ДСР, ЭМР) можно применять в различных буферах при различных концентрационных и температурных условиях, что расширяет возможности исследования устойчивости покрытий из альбумина на МНЧ.

Также были проанализированы особенности влияния окисления альбумина и поверхности МНЧ на устойчивость и целостность покрытия. Было показано увеличение устойчивости при тех же концентрациях белка при использовании окисленного белка по сравнению с неокисленным и снижение устойчивости и целостности покрытия в результате окисления поверхности МНЧ.

Выполнен анализ влияния концентрации белка (соотношения ЧСА/МНЧ) и продолжительности инкубации на устойчивость и целостность покрытий. С использованием конъюгата ЧСА с краси-

телем Су5 по сигналу Су5 спектрофотометрически и спектрофлуориметрически были проведены количественные оценки адсорбционного связывания ЧСА с поверхностью МНЧ, способности ЧСА к десорбции и обмену на поверхности МНЧ.

В рамках проводимого коллективом исследования, таким образом, был осуществлен подбор условий модификации наночастиц белком с получением устойчивых и целостных покрытий, обладающих потенциалом применения при создании функциональных гибридных систем для биомедицинского применения, а также проведена разработка новых подходов к определению качественного и количественного состава белкового покрытия на поверхности наночастиц в дисперсии.

Работы выполнены с использованием оборудования ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН. Исследования, направленные на отработку условий получения устойчивых и целостных покрытий из ЧСА на МНЧ, проводятся при финансовой поддержке за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10150, <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>.

Список литературы

1. Pederzoli F., Tosi G., Vandelli M.A., Belletti D., Forni F., Ruozi B. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2017. Vol. 9. P. 1–23.
2. Jonathan Ashby, Songqin Pan, and Wenwan Zhong. Size and Surface Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles Influence the Composition and Dynamic Nature of Their Protein Corona *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2014. Vol. 6, No. 17. P. 15412–15419.
3. Diaz-Diestra D.M., Palacios-Hernandez T., Liu Y., Smith D.E., Nguyen A.K., Todorov T., Gray P.J., Zheng J., Skoog Sh.A., Goering P.L. Impact of Surface Chemistry of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Protein Corona Formation and Endothelial Cell Uptake, Toxicity, and Barrier Function. *Toxicological Sciences.* 2022. Vol. 188, Issue 2. P. 261–275.
4. Martínez-Negro M., González-Rubio G., Aicart E., Landfester K., Guerrero-Martínez A., Junquera E. Insights into colloidal nanoparticle-protein corona interactions for nanomedicine applications. *Advances in Colloid and Interface Science.* 2021. Vol. 289. P. 102366.
5. Bychkova A.V., Lopukhova M.V., Wasserman L.A., Degtyarev Y.N., Kovarski A.L., Chakraborti S., Mitkevich V.A. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2022. Jan 1.

УДК 615.214.32

*Ахмедов Т.Р.¹, Чулков А.В.², Вафина А.Б.³
Марийский государственный университет,
Йошкар-Ола*

¹Gabsssburg@mail.ru; ²aleksanderchulkow@mail.ru; ³Vafali03@list.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПСИЛОЦИНА КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОЙ ХИМИИ

Несмотря на определенные успехи в медикаментозном лечении аффективных расстройств, продолжают поиски перспективных препаратов связанных с тяжелыми побочными эффектами и негативным влиянием на системы организма, существующих лекарственных средств. В рамках нашей гипотезы псилоцин обладает сравнимым с серотонином и существующими современными препаратами сродством к рецептору, а возможно превосходящим их, кроме того согласно исследованиям при его метаболизировании обладает меньшим негативным влиянием на системы организма.

***Ключевые слова:** фармакология, молекулярный докинг, квантовая химия, квантовая механика, серотониновые рецепторы, аффективные расстройства.*

*Akhmedov T.R., Chulkov A.V., Vafina A.B.
Mari State University,
Yoshkar-Ola*

RESEARCH OF PSILOCIN AS A PROMISING SEROTONIN RECEPTOR INHIBITOR BY COMPUTER CHEMISTRY METHODS

Despite certain successes in the medical treatment of affective disorders, the search for promising drugs associated with severe side effects and negative effects on the systems of organism, existing medicines continues. Within the framework of our hypothesis, psilocin has a receptor affinity comparable to serotonin and existing modern drugs, and possibly superior to them, in addition, according to studies, it has less negative effects on body systems during its metabolism.

***Keywords:** pharmacology, molecular docking, quantum chemistry, quantum mechanics, serotonin receptors, affective disorders.*

Введение. Несмотря на определенные успехи в медикаментозном лечении аффективных расстройств, продолжают поиск перспективных препаратов связанных с тяжелыми побочными эффектами и негативным влиянием на системы организма, существующих лекарственных средств [10–12]. В рамках нашей гипотезы псилоцин

обладает сравнимым с серотонином и существующими современными препаратами сродством к рецептору, а возможно превосходящим их, кроме того согласно исследованиям при сравнительно высоком сродстве псилоцина к рецептору, при его метаболизировании обладает меньшим негативным влиянием на системы организма [6].

Псилоцибиновые грибы были известны человечеству с очень ранних времен. Их применяли в религиозных, спиритических и духовных практиках на протяжении многих тысяч лет. Псилоцин как продукт дефосфорилирования псилоцибина, был выделен химиком Альбертом Хофманном в 1959 г. После чего начались его исследования и уже тогда в 1950–1960-х годах после проведённых клинических наблюдений он показал свой терапевтический потенциал для пациентов, страдающих депрессивными симптомами, тревогой и конверсионным расстройством. Псилоцибин был классифицирован как вещество Списка I в 1971 г., но интерес к психоделикам с того времени почти не изменился, в связи с чем в 1990-х годах его исследования возобновили. Последние исследования псилоцина дополнительно показали его потенциал в лечении пациентов с различными видами депрессий, тревожными расстройствами и другими аффективными расстройствами, что наводит на гипотезу о его терапевтическом использовании [6, 8].

Актуальность. С ускорением темпов жизни в современном обществе мы всё чаще сталкиваемся с проблемами психического здоровья, в связи с истощением нервной системы, снижением адаптационных возможностей организма человека. Что приводит к снижению числа работоспособного населения, снижению рождаемости и уровня жизни, а также к суициду и многим другим факторам, разрушающим социум, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) среди женского населения распространенность депрессии на 50% выше чем среди мужского, более 10% беременных женщин и после родов испытывают депрессию. Самоубийства занимают четвертое место среди ведущих причин смертности в возрастной группе 15–29 лет [9]. Согласно национальному проекту по охране здоровья населения особенную важность представляют исследования в области разработки новых лекарственных средств, персонализированной и цифровой медицины, внедрение инновационных медицинских технологий, а также сохранения психического здоровья [13].

Цель. Оценить степень связывания псилоцина с рецепторами 5-НТ1А и 5-НТ2А и на основе этого сделать вывод о возможности применения его как лекарственного препарата или фармакофора.

Задачи

1. Проанализировать строение серотониновых рецепторов 5-HT_{2A} и 5-HT_{1A}.
2. Провести моделирование связывания серотонина и псилоцина с каждым из выбранных рецепторов.
3. Сравнение степени взаимодействия данных серотонина и псилоцина с данными рецепторами.
4. Анализ полученных результатов.

Методы. Работа была произведена методами компьютерной химии. В рамках нашей гипотезы мы сравнивали прочность связывания серотонинового рецептора человека 5HT_{2A} с серотонином и псилоцином, так как в ходе метаболических превращений в организме в него преобразуется псилоцибин. Модель рецептора для расчета была получена на основе рентгеноструктурного анализа [1, 2]. Оптимизация и подготовка модели для расчетов была произведена в программе UCSF Chimera 1.16. Модели лигандов были подготовлены квантово-химическими методами в программе ORCA 5.0 [3]. Для оптимизации был использован метод MD BLYP с тремя диффузными орбиталями и базисом def2-SVP. Расчет энергии связывания рецептора и лигандов был произведен с использованием программы AutoDock Vina [5]. Расчеты были произведены на вычислительных мощностях суперкомпьютера MarGrid.

Основная часть. В 1959 г. швейцарский ученый Альберт Хофманн и его ассистент Ханс Чертер выделили псилоцин и его эфир фосфорной кислоты псилоцибин. Дальнейшее их исследования в 1960-х годах показало его терапевтический потенциал в лечении таких расстройств, как депрессия, тревожное расстройство и ПТСР [4].

К настоящему времени среди подходов в медикаментозной терапии аффективных расстройств наибольшей популярностью пользуются препараты в основе действия которых лежит ингибирование обратного захвата серотонина [7]. Среди них большое распространение имеют следующие антидепрессанты эсциталопрам, амитриптилин и флуоксетин. Механизм действия данных препаратов заключается в селективном ингибировании обратного захвата серотонина, повышает концентрацию нейромедиатора в синаптической щели. Эсциталопрам практически не связывается с серотониновыми (5-HT), допаминовыми (D₁ и D₂) рецепторами, α -адрено-, м-холинорецепторами, а также с бензодиазепиновыми и опиоидными рецепторами. Эффект развивается через 2-4 недели после начала приёма, максимальный терапевтический эффект достигается при-

мерно через 3 месяца [10]. Амитриптилин обладает высоким сродством к м-холинорецепторам, что обуславливает его высокую антихолинэргическую активность, а также имеет сильный седативный эффект связанным со сродством к гистаминовым H_1 -рецепторам, и альфа-адреноблокирующим действием. Антидепрессивный эффект наступает после 2-3 недель после начала приёма [11]. Флуоксетин повышает серотонинергическую передачу, по механизму отрицательной мембранной связи ингибирует обмен нейромедиатора. Не оказывает прямого действия на серотониновые, м-холинэргические, H_1 -гистаминовые и альфа-адренорецепторы. Стойкий клинический эффект наступает через 1-2 недели лечения [12].

При всей своей эффективности данные препараты имеют ряд серьезных побочных эффектов. Два из трёх препаратов оказывают сильное седативное действие (кроме флуоксетина), имеют анорексигенное действие, вызывают рвоту, диарею, приливы, головные боли и головокружения.

Кроме того серотониновая теория возникновения депрессии подвергается критике и не охватывает весь спектр возможных причин ее возникновения [7].

В связи с этим существует необходимость поиска альтернативных препаратов и перспективных фармакофоров на основе веществ обладающих не только высоким сродством к серотониновым рецепторам, но и характеризующихся комплексным терапевтическим эффектом. Одним из таких химических веществ является псилоцин из опубликованных статей посвящённых таким психическим расстройствам как депрессия, обсессивно-компульсивное расстройство и расстройство связанное с употреблением психоактивных веществ (табак и алкоголь) псилоцин показал относительно безопасный профиль и многообещающие результаты. При этом оценивались показатели психиатрических рейтинговых шкал по которым псилоцин показал снижение таковых. Исследования депрессии были наиболее эффективными, подтверждённые тремя рандомизированными контролируемыми опытами [4].

Псилоцибин — это вещество из группы классических психоделиков. Его основной активный метаболит псилоцин, получается после дефосфорилирования псилоцибина в слизистой оболочке кишечника. Эти вещества имеют преобладающую агонистическую активность на серотониновые рецепторы такие как $5HT1A$ и $5HT2A$, последний считают основным в галлюциногенном эффекте [4],[8].

Экспериментальные исследования. В нашей работе мы сосредоточились на изучении методами компьютерной химии, механизмов взаимодействия псилоцина с серотониновыми рецепторами 5HT1A и 5HT2A, а именно на аффинности псилоцина к указанным рецепторам в сравнении с эталонным веществом. Для рецептора 5HT1A нами был выбран серотонин который с точки зрения физиологии является основным веществом взаимодействующим с данными рецепторами. А для рецептора 5HT2A псилоцин.

На данном этапе исследования мы применили метод молекулярного докинга для оценки степени связывания отличающийся экспрессностью с точки зрения затрат машинного времени и приемлемыми результатами по точности [5].

Молекулярный докинг является методом первоначального исследования, применяется для изучения малых молекул в системе белок-лиганд и основывается на математической оценке электростатических межмолекулярных взаимодействий лиганда и рецептора. Первоначально нами была осуществлена предварительная подготовка компьютерных моделей псилоцина и серотонина квантово-механическими расчетами в программе ORCA 5.0.[3], которая включала в себя оптимизацию геометрии молекул и расчет их эффективных зарядов. Для оптимизации был использован метод функционала плотности DFT с использованием гибридного функционала PBE0 в базе def2-TZVP с применением метода самосогласованного поля SCF.

Подготовка рецептора. Для расчета нами были взяты структуры рецепторов, полученные методом рентгеноструктурного анализа [1],[2]. Исходные PDB файл нуждаются в дальнейшей подготовке. Достаивание боковых цепей и насыщение структур атомами водорода производилось с помощью программы USCF Chimera 1.16. Удаление кристаллической воды, расчет зарядов атомов рецептора, определение сайтов связывания и областей возможного присоединения лигандов были получены с использованием пакета программ AutoDock Tools 1.5.6.[5].

Нами была произведена серия расчетов для каждого рецептора. Оценивались энергии связывания в зависимости от положения лигандов.

В результате расчетов нами были получены следующие энергии связывания, для лучших положений лигандов с учетом среднеквадратичного отклонения от рентгено-структурных данных для 5-HT1A (рис. 1 С, D) у серотонина — 7.9122 ккал/моль, а для пси-

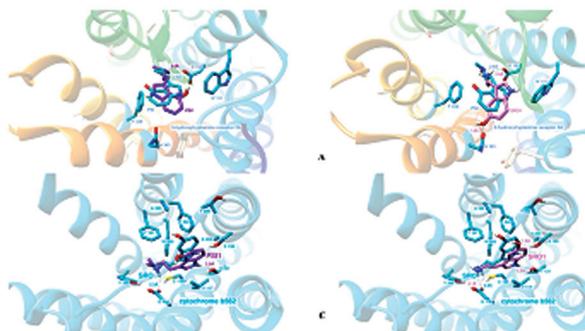


Рис. 1. Визуализированные системы лиганд-рецептор. А — рецептор 5-НТ2А сравнение псилоцин-псилоцин. В — рецептор 5-НТ2А сравнение псилоцин-серотонин. С — рецептор 5-НТ1А сравнение серотонин-псилоцин. D — рецептор 5-НТ1А сравнение серотонин-серотонин

лоцина -6.4202 ккал/моль, сводные данные по энергиям взаимодействия представлены в табл. 1.

Таблица 1. Сводные данные по энергии взаимодействия

Виды взаимодействий	Серотонин, энергии ккал/моль	Псилоцин, энергии ккал/моль
Расчетная свободная энергия связи	-7,757	-6,281
Конечная межмолекулярная энергия	-8,945	-7,559
Лиганд-рецептор	-4,886	-6,979
Боковые цепи, сгибающие лиганд	-4,059	-0,581
Конечная общая внутренняя энергия	-13,064	-13,524
Лиганд	-0,133	-0,284
Гибкий рецептор	-11,003	-11,301
Гибкие боковые цепи	-1,927	-1,939
Свободная энергия при кручении	1,360	1,285
Энергия несвязанной системы	-12,891	-13,518

Для рецептора 5-HT_{2A}, метод показал ограниченную эффективность однако дал сходные результаты по значениям энергии для лучших положений лигандов (рис. 1, А, В) у серотонина –7,0024 ккал/моль, а для псилоцина –6,8289 ккал/моль, сводная данные по энергиям взаимодействия представлены в табл. 2.

Таблица 2. Сводные данные по энергии взаимодействия

Виды взаимодействий	Серотонин, энергии ккал/моль	Псилоцин, энергии ккал/моль
Расчетная свободная энергия связи	-7,809	-7,857
Конечная межмолекулярная энергия	-9,209	-9,013
Лиганд-рецептор	-6,465	-7,386
Боковые цепи, сгибающие лиганд	-2,744	-1,627
Конечная общая внутренняя энергия	-11,360	-11,643
Лиганд	-0,092	-0,258
Гибкий рецептор	-10,153	-10,319
Гибкие боковые цепи	-1,115	-1,066
Свободная энергия при кручении	1,369	1,608
Энергия несвязанной системы	-11,391	-11,191

Таким образом, результаты расчетов показывают, что аффинность псилоцина сравнима или несколько ниже, чем у серотонина. Из чего следует, что эффективность и терапевтический эффект псилоцина вероятнее всего определяется комплексом факторов, а не только степенью связывания с серотониновыми рецепторами. На основе полученных данных, для дальнейшего изучения нами будут применены более совершенные вычислительные методы компьютерной химии, а именно метод молекулярной динамики, а также рассчитаны энергии взаимодействия для других рецепторов характеризующихся взаимодействием с псилоцином.

Заключение. Метод молекулярного докинга и его естественное продолжение метод молекулярной динамики на данный момент является наиболее перспективным и экономически выгодным с точки

зрения поиска новых лекарственных веществ, а также для оценки эффективности уже существующих. Применённый метод молекулярного докинга показывает более высокую эффективность для крупных систем. Так, для рецептора 5-НТ1А (13639 атомов) результаты лучше согласуются с кристаллографическими данными, чем для рецептора 5-НТ2А (5736 атомов), что объясняется использованным в методе математическим аппаратом. В случае меньших систем требуются дополнительные расчеты, проигрывающие в экспрессности, но сильно превосходящие спектром изучаемых параметров, в частности, метод молекулярной динамики, метод QMMM — сочетание молекулярной механики и квантовой механики. Однако уже полученные данные показывают хорошую согласованность для соотношения аффинности серотонина и псилоцина применительно к обоим рецепторам. Исходя из полученных данных можно заключить, что псилоцин не только перспективен как лекарственное вещество, но и как фармакофор на основе которого можно синтезировать препарат нового поколения, обладающий высокой эффективностью и комплексностью терапевтических эффектов с меньшим побочным воздействием.

Список литературы

1. Xu P., Huang S., Zhang H., Mao C., Zhou, X.E., Shen D.D., Jiang Y., Zhang Y., Xu H.E. Funding Organization(s): National Natural Science Foundation of China (NSFC) [Электронный ресурс] Deposited: 2021-02-07. Released: 2021-04-14. Deposition. Режим доступа: <https://www.rcsb.org/structure/7wc5>
2. Cao D., Yu J., Wang H., Luo Z., Liu X., He L., Qi J., Fan L., Tang L., Chen Z., Li J., Cheng J., Wang S. Funding Organization(s): Ministry of Science and Technology (MoST, China), National Natural Science Foundation of China (NSFC), Chinese Academy of Sciences. [Электронный ресурс] Deposited: 2021-12-18. Released: 2022-01-26. Deposition. Режим доступа: <https://www.rcsb.org/structure/7WC4>
3. Caldeweyher E., Bannwarth C., Grimme S. J. Chem. Phys. 2017. 147. 034112. E.Caldeweyher, S.Ehlert, A.Hansen, H.Neugebauer, S.Grimme, J. Chem. Phys. 2018. In progress
4. Barrett F.S., Doss M.K., Sepeda N.D., Pekar J.J., Griffiths R.R. Emotions and brain function are altered up to one month after a single high dose of psilocybin // Sci Rep. 2020 Feb 10;10(1):2214. doi: 10.1038/s41598-020-59282-y. PMID: 32042038; PMCID: PMC7010702. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-59282-y>

5. New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings, J. Chem. Inf. Model. J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, and S. Forli AutoDock Vina 1.2.0: (2021) DOI 10.1021/acs.jcim.1c00203 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://github.com/ccsb-scripps/AutoDock-Vina>

6. Psilocybin in neuropsychiatry: a review of its pharmacology, safety, and efficacy. Dodd S., Norman T.R., Eyre H.A., Stahl S.M., Phillips A., Carvalho A.F., Berk M.. CNS Spectr. 2022 Jul 11:1-11. doi: 10.1017/S1092852922000888. Epub ahead of print. PMID: 35811423. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.cambridge.org/core/journals/cns-spectrums/article/psilocybin-in-neuropsychiatry-a-review-of-its-pharmacology-safety-and-efficacy/AA1FB4F-49C14BA3F398238D6E5A3947A>

7. The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. Moncrieff J., Cooper R.E., Stockmann T., Amendola S., Hengartner M.P., Horowitz M.A.. Mol Psychiatry. 2022 Jul 20. doi: 10.1038/s41380-022-01661-0. Epub ahead of print. PMID: 35854107. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.nature.com/articles/s41380-022-01661-0>

8. What is the clinical evidence on psilocybin for the treatment of psychiatric disorders? A systematic review. Castro Santos H., Gama Marques J.. Porto Biomed J. 2021 Feb 11;6(1):e128. doi: 10.1097/j.pbj.000000000000128. PMID: 33884324; PMCID: PMC8055489. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://journals.lww.com/pbj/Fulltext/2021/02000/What_is_the_clinical_evidence_on_psilocybin_for.22.aspx

9. WHO. Depressive disorder (depression) [Электронный ресурс] / WHO. 2023. Режим доступа: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>

10. Справочник лекарственных средств Vidal. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.vidal.ru/drugs/escitalopram>

11. Справочник лекарственных средств Vidal. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.vidal.ru/drugs/amitriptyline__18918

12. Справочник лекарственных средств Vidal. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.vidal.ru/drugs/fluoxetine__6124

13. Федеральный проект «Укрепление общественного здоровья». 04 апреля 2023 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://minzdrav.gov.ru/poleznye-resursy/natsproektzdravoohranenie/zozh>

УДК 543; 543.2; 543.6

Беляев А.П.¹, Беляева С.А.²

¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург

²Всероссийский научно-исследовательский геологический институт им. А.П. Карпинского,

Санкт-Петербург

Alexei.Belyaev@pharminnotech.com

СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КОМПЕТЕНТНОСТИ АНАЛИТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

С целью демонстрации возможностей сличительных испытаний представлены результаты различных статистических методов оценки компетентности аналитических лабораторий на примере анализа пищевого продукта, производимого и реализуемого на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: *пищевые продукты, методы повышения качества пищевых продуктов, повышение компетентности экспериментальных лабораторий, межлабораторные сличительные испытания, математические методы анализа, нормативная база межлабораторных сличительных испытаний.*

Belyaev A.P.¹, Belyaeva S.A.²

¹St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg

²All-Russian Scientific Research Geological Institute named after. A.P. Karpinsky,

St. Petersburg

COMPARISON OF DIFFERENT STATISTICAL METHODS FOR ASSESSING THE COMPETENCE OF ANALYTICAL LABORATORIES

In order to demonstrate the capabilities of comparison tests, the results of various statistical methods for assessing the competence of analytical laboratories are presented using the example of the analysis of food products produced and sold on the territory of the Russian Federation.

Keywords: *food products, methods for improving the quality of food products, increasing the competence of experimental laboratories, interlaboratory comparison tests, mathematical methods of analysis, regulatory framework for interlaboratory comparison tests.*

Метрология фундаментальным образом поддерживает здравоохранение, является условием обеспечения безопасности производства пищевых продуктов. Одним из критериев компетентности и подтверждения достоверности результатов измерений является оценка деятельности лабораторий путем участия в проверках квалификации, реализуемых через межлабораторные сравнительные испытания (МСИ).

В [1] рассматривалась возможность МСИ для оценки компетентности при вычислении межлабораторного стандартного отклонения $\hat{\sigma}$.

В связи с разнообразием и неоднозначностью априорной информации при планировании МСИ п. 6.2-6.6. ГОСТ Р ИСО 13528-2010 в настоящей работе описано несколько подходов, используемых для определения межлабораторного стандартного отклонения оценки компетентности $\hat{\sigma}$, а именно выбор на основе:

- приписанного или желаемого значения $\hat{\sigma}$ в условиях межлабораторной прецизионности на основании доступности информации о повторяемости и воспроизводимости, неопределенности получаемого результата измерений или испытаний;

- общей модели воспроизводимости аналитического метода;

- межлабораторной прецизионности, полученной в результате конкретного эксперимента (робастный анализ).

Экспериментальная часть. Участники эксперимента руководствовались принципом использования в лабораторной деятельности идентичных нормативных документов на методы испытаний (табл. 1) [2, 3]. Фактически приняли участие 46 испытательных лабораторий ($p=46$) условиях, обеспечивающих участникам самостоятельный выбор показателя из предложенных в МСИ. Испытания выполнены в условиях повторяемости.

Таблица 1. Перечень нормативных документов, используемых участниками эксперимента

Объект МСИ	Контролируемый показатель	Нормативный документ
Батон «Дачный» из муки пшеничной хлебопекарной высшего сорта. Изготовлено и упаковано по СТО 00345458-9115/003 [4]; срок годности 5 суток	массовая доля жира	ГОСТ 5668, п. 2 [2]
	массовая доля белка	ГОСТ 25832, п. 3.5 [3]

Приписанные значения контролируемых показателей получены в соответствии с п.5.2.1 ГОСТ Р ИСО 13528-2010 [5] как средние арифметические значения всех результатов испытаний \bar{x} . Стандартная неопределенность [5, 6] приписанного значения u_x рассчитывалась по формуле:

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

где u_i — неопределенность каждого результата испытаний.

Незначимость неопределенности приписанного значения была подтверждена при проверке неравенства

$$u_x \leq 0,3 \cdot \hat{\sigma}$$

Проверка однородности и стабильности объекта МСИ проводилась и была установлена в соответствии с п. 4.4 ГОСТ Р ИСО 13528-2010 [5]. Результаты, полученные при проверке однородности и стабильности, не учитывались при обработке результатов испытаний образцов для МСИ, полученных зарегистрированными участниками МСИ.

Результаты испытаний, полученные от Участников, обрабатывались по согласно методикам, изложенным в [5, 6].

Все результаты, полученные в эксперименте $x = x_i$ проверялись на наличие статистических выбросов с использованием критерия Граббса (п. 5.1 ГОСТ Р ИСО 13528-2010 [5] и п. 7.3.4 ГОСТ Р ИСО 5725-(2-6) [6]). Критические значения для критерия Граббса представлены в табл. 2.

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

$$G_p = \frac{(x_{max} - x)}{s}$$

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

$$G_1 = \frac{(x - x_{min})}{s}$$

где x — среднее значение результатов измерений;

Таблица 2. Критические значения критерия Граббса

Р	Одно наибольшее или одно наименьшее	
	свыше 1%	свыше 5%
22	3,060	2,758
37	3,343	3,003
38	3,356	3,014
39	3,369	3,025
40	3,381	3,036
42	3,405	3,058
43	3,417	3,069

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 отбрасывался, а расчеты повторялись, но с меньшим числом членов вариационного ряда ($p - 1$).

Аналогичным образом проверяли критерий Граббса G_1 .

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.

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

Таблица 3. Приписанные значения и их стандартная неопределенность

Контролируемый показатель	Единица измерения	Р	Приписанное значение, \bar{x}	Стандартная неопределенность приписанного значения, u_x
Массовая доля жира	%	38	5,15	0,05
Массовая доля белка	%	22	11,07	0,001

Оценка стандартного отклонения компетентности ' $\hat{\sigma}$ ' проведена различными способами, а именно:

Определение межлабораторного стандартного отклонения оценки компетентности ' $\hat{\sigma}$ ' в соответствии с требованиями о повторяемо-

сти и воспроизводимости аналитического метода, установленными в нормативной документации на методы испытаний.

Оценку межлабораторного стандартного отклонения компетентности $\hat{\sigma}$ проводили в соответствии с п. 6.2.1, п. 6.5.1 ГОСТ Р ИСО 13528-2010 [4] согласно стандартному отклонению воспроизводимости σ_R их стандартному отклонению повторяемости σ_r и межлабораторному стандартному отклонению σ_L :

$$\sigma_R = \frac{R}{2,8}; \sigma_r = \frac{r}{2,8} ; \sigma_L = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2} \text{ и, соответственно}$$

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

Определение межлабораторного стандартного отклонения оценки компетентности $\hat{\sigma}$ на основе общей модели воспроизводимости аналитического метода.

Оценка межлабораторного стандартного отклонения компетентности проводили в соответствии с п. 6.4.2 ГОСТ Р ИСО 13528-2010 [5] на основе общей модели воспроизводимости аналитического метода с использованием уравнения Хорвица для оценки межлабораторного стандартного отклонения σ_L :

$$\sigma_R = 0,02 \cdot C^{0,8495} \text{ и, соответственно} \quad \hat{\sigma} = \sigma_r$$

Определение межлабораторного стандартного отклонения оценки компетентности $\hat{\sigma}$ на основе анализа экспериментальных данных, полученных в рамках МСИ.

Оценку стандартного отклонения компетентности выполнили в соответствии с п. 6.6.1 ГОСТ Р ИСО 13528-2010 [5] и п. 6.2 ГОСТ Р ИСО 5725-5-2002 [6]. Стандартное отклонение компетентности приняли робастным стандартным отклонением результатов, указанных всеми участниками и вычисленным в соответствии с алгоритмом робастного анализа (ГОСТ Р ИСО 13528-2010, алгоритм А приложение С [5]):

общее число данных расположили в порядке возрастания:

$$x_1; x_2; \dots \dots \dots; x_j; x_p.$$

Робастное среднее и робастное стандартное отклонение этих данных обозначили как x^* и s^* . Первоначальные значения для x^* и s^* рассчитали как:

$$x^* = \text{медиана от } x_i (i = 1, 2, \dots, p); s^* = 1,483 \cdot \text{медиана от } |x_i - x^*| (i = 1, 2, \dots, p)$$

Значения x^* и s^* корректировали с использованием φ :

$\varphi = 1,5 \cdot s^*$ и для каждого $x_i (i = 1, 2, \dots, p)$ вычисляли:

$$x^* = \begin{cases} x^* - \varphi, & \text{если } x_i < x^* - \varphi \\ x^* + \varphi, & \text{если } x_i > x^* + \varphi \\ x_i, & \text{иное} \end{cases}$$

Рассчитали новые значения x^* и s^* по формулам:

$$x^* = \sum_{i=1}^p \frac{x_i^*}{p} \quad s^* = 1,134 \sqrt{\sum_{i=1}^p \frac{(x_i^* - x^*)^2}{(p-1)}}$$

Для принятия решения о возможности применения робастного среднего в качестве приписанного значения проверили превышение разности $(x^*_{\text{робастное}} - x)$ своей стандартной неопределенности, применили робастного среднего в качестве приписанного значения при оценке z-индекса.

Оценку статистики, характеризующую работу каждой лаборатории — участника МСИ, провели в соответствии с п. 7.4 ГОСТ Р ИСО 13528-2010 [6] с использованием величины z-индекса (табл. 4), вычисленного по формуле:

Таблица 4. Интерпретация z-индекса в соответствии с п. 7.4.2 ГОСТ Р ИСО 13528-2010 [5]

z-Индекс $3 < z < -3$	Интерпретация z-индекса	Оценка качества проведения испытаний 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

Результаты и их обсуждение. Результаты оценки межлабораторного стандартного отклонения оценки компетентности $\hat{\sigma}$ и индивидуальной статистики, характеризующей работу лабораторий-участников МСИ (z-индекс) приведены в табл. 5*.

Таблица 5. Значения межлабораторного стандартного отклонения оценки компетентности $\hat{\sigma}$ и z-индекса при определении массовой доли жира (%) и массовой доли белка (%)

№ п/п	Шифр участника	Массовая доля жира (%) по ГОСТ 5668			Шифр участника	Массовая доля белка (%) по ГОСТ 25832		
		$\hat{\sigma}$ при $p=38$				$\hat{\sigma}$ при $p=28$		
		0,334	0,556	0,92		0,126	0,301	1,07
		z-индекс				z-индекс		
		по НД	по Хорвицу	робастный анализ		по НД	по Хорвицу	робастный анализ
1	40	-9,2	-19,6	-3,8	42	КВС**	КВС**	КВС**
2	17	-4,3	-9,2	-2,0	17	-19,0	-13,6	-4,1
3	2	-4,1	-8,8	-1,9	21	-18,3	-13,1	-3,9
4	7	-4,1	-8,8	-1,9	24	-8,9	-6,4	-2,0
5	24	-4,1	-8,8	-1,9	36	-3,5	-2,5	-0,9
6	31	-4,1	-8,8	-1,9	40	-3,0	-2,2	-0,9
7	32	-4,1	-8,8	-1,9	23	-1,9	-1,3	-0,6
8	41	-4,1	-8,8	-1,9	43	-1,4	-1,0	-0,5
9	43	-3,8	-4,1	-1,8	39	-0,7	-0,5	-0,4
10	26	-3,5	-4,5	-1,7	1	-0,6	-0,4	-0,4
11	21	-3,2	-3,8	-1,6	41	-0,2	-0,2	-0,3
12	34	-3,2	-2,8	-1,6	12	0,7	0,5	-0,1
13	36	-3,2	-2,8	-1,6	13	0,7	0,5	-0,1
14	37	-2,4	-1,9	-1,3	9	1,2	0,8	0,0
15	13	-1,7	-1,9	-1,0	37	1,2	0,9	0,0
16	12	-1,1	-1,7	-0,8	27	2,3	0,9	0,2
17	39	0,7	-1,5	-0,2	8	2,5	1,8	0,3
18	28	0,9	0,2	-0,1	15	2,5	1,8	0,3

Окончание табл. 5

№ п/п	Шифр участ- ника	Массовая доля жира (%) по ГОСТ 5668			Шифр участ- ника	Массовая доля белка (%) по ГОСТ 25832			
		$\hat{\sigma}$ при $p=38$				$\hat{\sigma}$ при $p=28$			
		0,334	0,556	0,92		0,126	0,301	1,07	
		z-индекс				z-индекс			
		по НД	по Хорвицу	робаст- ный анализ			по НД	по Хорвицу	робаст- ный анализ
19	30	1,0	0,8	-0,1	28	2,7	1,9	0,3	
20	1	1,3	0,8	0,1	18	3,5	2,5	0,4	
21	11	1,3	0,8	0,1	29	3,5	2,5	0,4	
22	23	1,3	1,2	0,1	30	4,0	2,9	0,6	
23	25	1,6	1,4	0,2	4	4,1	2,9	0,6	
24	42	1,7	1,5	0,2	6	4,4	3,2	0,6	
25	3	1,9	1,5	0,3	22	4,9	3,5	0,7	
26	6	1,9	1,9	0,3	2	5,8	4,2	0,9	
27	18	1,9	2,0	0,3	26	6,1	4,4	1,0	
28	8	2,2	2,2	0,4	34	7,5	5,4	1,3	
29	15	2,5	2,3	0,5	—	—	—	—	
30	22	2,5	4,3	0,5	—	—	—	—	
31	4	2,8	5,0	0,6	—	—	—	—	
32	14	3,0	6,4	0,7	—	—	—	—	
33	9	3,4	7,3	0,8	—	—	—	—	
34	29	3,7	7,9	0,9	—	—	—	—	
35	5	4,3	9,2	1,1	—	—	—	—	
36	19	5,8	12,4	1,7	—	—	—	—	
37	35	6,1	13,0	1,8	—	—	—	—	
38	27	8,5	18,1	2,7	—	—	—	—	

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

** Квазивыброс.

Если метод испытаний, используемый в МСИ, стандартизирован и информация относительно повторяемости и воспроизводимости метода доступна, расчет межлабораторного стандартного отклонения целесообразно выполнить с учетом этих данных для оценки прецизионности полученных экспериментальных данных. Преимуществом этого подхода является то, что $\hat{\sigma}$ непосредственно связано с методом испытаний и позволяет использовать значение $\hat{\sigma}$ при повторении раунда МСИ при условии обеспечения стабильности приписанного значения.

Выбор расчета стандартного отклонения проверки компетентности на основе общей модели воспроизводимости аналитического метода или робастного анализа обусловлен отсутствием информации относительно повторяемости и воспроизводимости метода.

Недостатком общей модели воспроизводимости аналитического метода является то, что истинная воспроизводимость конкретного метода измерений может существенно отличаться от этого значения, поскольку использование общей модели предполагает, что воспроизводимость зависит только от значения измеряемой величины и не зависит от самой измеряемой величины, процедуры измерений или объема массива экспериментальных данных, например, допущение модели Хорвица основано на том, что метод испытаний основан на содержании химических компонент^в % (массовая доля) и межлабораторное стандартное отклонение σ_L имплицитивно зависит от приписанного значения \bar{x} показателя в объекте МСИ, и не ограничено применяемым методом испытаний.

Недостаток метода оценки $\hat{\sigma}$ на основе экспериментальных данных, заключается в том, что $\hat{\sigma}$ определяется по результатам, указанным участниками одного и того же МСИ, и может существенно изменяться от эксперимента к эксперименту, что не позволяет применить результаты участия в МСИ для прогнозной оценки аналитической деятельности лаборатории и выявления методических тенденций. Устранение этого недостатка может быть достигнуто за счет использования робастного объединенного значения стандартных отклонений, полученных в нескольких раундах МСИ, что является трудоемкой процедурой.

Результаты оценки разных способов расчета межлабораторного стандартного отклонения и влияние выбранного способа расчета $\hat{\sigma}$ на величину статистики, характеризующей работу лаборатории-участника МСИ, приведены в табл. 6.

Таблица 6. Результаты оценки величины z-индекса при использовании разных способов расчета межлабораторного стандартного отклонения при реализации МСИ

$\hat{\sigma}$ при определении массовой доли жира (%) установлено на основании	% от числа лабораторий, проводивших испытания по показателю		
	$-2 \leq z \leq 2$	$-3 \leq z < -2;$ $2 < z \leq 3$	$3 < z < -3$
пределов повторяемости и воспроизводимости согласно требованиям ГОСТ 5668	34	16	50
общей модели воспроизводимости аналитического метода	37	10	53
робастного анализа в условиях изучения межлабораторной прецизионности	98	1	1
$\hat{\sigma}$ при определении массовой доли белка (%) установлено на основании	% от числа лабораторий, проводивших испытания по показателю		
	$-2 \leq z \leq 2$	$-3 \leq z < -2;$ $2 < z \leq 3$	$3 < z < -3$
пределов повторяемости и воспроизводимости согласно требованиям ГОСТ 25832	50	–	50
общей модели воспроизводимости аналитического метода	61	7	32
робастного анализа в условиях изучения межлабораторной прецизионности	89	–	11

Заключение. Расчет межлабораторного стандартного отклонения $\hat{\sigma}$ оптимален как с точки зрения объективности расчета статистики, характеризующей работу лаборатории (z-индекс), так и с целью анализа достоверности результатов, направленного на выявление тенденций при использовании конкретного метода испытаний в лаборатории.

Список литературы

1. Беляев А.П., Морохов Д.А. Повышение объективности анализа в аналитической химии // 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. Часть 1. С. 31-42.

2. ГОСТ 5668-68 Хлебобулочные изделия. Методы определения массовой доли жира.

3. ГОСТ 25832-89 Изделия хлебобулочные диетические. Технические условия.

4. СТО 00345458-9115/003-2007 Изделия булочные из пшеничной муки. Требования.

5. ГОСТ Р 50779.60-2017 (ИСО 13528:2015) Статистические методы. Применение при проверке квалификации посредством межлабораторных испытаний.

6. ГОСТ Р ИСО-(1-6)-5725-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений: Часть 1. Основные положения и определения; Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений; Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений; Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений; Часть 5. Альтернативные методы определения прецизионности стандартного метода измерений; Часть 6. Использование значений точности на практике.

УДК 547.856.1

Борищук А.Р.

*Волгоградский государственный
медицинский университет,*

Волгоград

alena.pluzh15@mail.ru

СИНТЕЗ НОВЫХ АЦЕТАНИЛИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1-МЕТИЛХИНАЗОЛИН-2,4(1H,3H)-ДИОНА

Проведен синтез 5 новых соединений — производных 1-метилхиназолин-2,4(1H,3H)-диона, обладающих потенциальной психотропной активностью. В синтезе использована методика направленного N-алкилирования в безводной среде высокополярного растворителя.

Ключевые слова: алкилирование, психотропная активность, ацетанилидные производные, синтез, вещества.

Borishchuk A.R.
Volgograd State Medical University,
Volgograd
alena.pluzh15@mail.ru

SYNTHESIS OF THE NOVEL ACETANILIDE DERIVATIVES OF 1-METHYLQUINAZOLINE-2,4(1H,3H)-DIONE

Synthesis of 5 new compounds — derivatives of 1-methylquinazolin-2,4-dione with potential psychotropic activity was carried out. The method of directed N-alkylation in an anhydrous medium of a highly polar solvent was used in the synthesis.

Keywords: alkylation, psychotropic activity, acetanilide derivatives, synthesis, substances.

Введение. Производные 1-метилхиназолина обладают психотропными свойствами, среди которых обнаруживается ингибирующее действие в отношении ГАМКА-рецепторов [1]. Ряд соединений с метилхиназолиновым гетероциклическим каркасом имеет высокий аффинитет к серотониновым 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторам [2]. Можно предположить, что данный класс веществ может использоваться, как перспективный источник анксиолитических соединений, которые могут стать основой для создания инновационных лекарственных препаратов.

Соединения с пиперазиновыми фрагментами, к примеру, нейролептик оксипертин, снотворное эзопиклон и другие, широко известны выраженным психотропным действием [3].

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что новые ацетанилидные производные 1-метилхиназолин-2,4(1H,3H)-диона с общим скаффолдом, включающим пиперазиновый цикл в качестве заместителя, могут быть перспективными в поиске веществ с анксиолитическим или антидепрессивным действием.

Цель работы. Синтез новых ацетанилидных производных 1-метилхиназолин-2,4(1H,3H)-диона как потенциальных фармакологически активных агентов.

Методика исследования. Спектры ЯМР ¹H и ¹³C регистрировали на спектрометре «Bruker Avance 600» (600 МГц для ¹H и 150 МГц для ¹³C) в ДМСО-*d*₆, внутренний стандарт тетраметилсилан. Интерпретацию спектров осуществляли с помощью лицензионной программы ACD/HNMR Predictor Pro 3 фирмы Advanced Chemistry Development (Канада). Температуры плавления измеряли в стеклянных капиллярах на приборе Mel-Temp 3 (Laboratory Devices Inc., США).

Общий метод получения ацетанилидных производных 1-метилхиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-диона.

К суспензии 2,0 г (11,4 ммоль) 1-метилхиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-диона и 4,0 г (28,9 ммоль) тонко измельченного безводного калия карбоната в 50 мл безводного ДМФА при комнатной температуре добавляют в один прием эквимольное количество соответствующего амида хлоруксусной кислоты и перемешивают в течение двух суток при той же температуре. Фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме, твердый остаток растирают с 50 мл воды, выдерживают при температуре 0-5 °С в течение суток, фильтруют, осадок промывают водой, сушат на воздухе, кристаллизуют из подходящего растворителя.

1-Метил-3-[2-[(4-метоксифенил)амино]]-2-оксоэтил]хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (1). Белое кристаллическое вещество, выход 62%, т.пл. 275-277 °С (ДМФА), R_f 0,70. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 3,30 (с, 3*H*, NCH_3); 3,71 (с, 3*H*, OCH_3); 4,95 (с, 2*H*, CH_2); 6,86-6,90 (м, 2*H*, ароматические *H*); 7,35 (т, 1*H*, $J=8$ Гц, H^6); 7,36 (д, 1*H*, $J=8$ Гц, H^8); 7,45-7,48 (м, 2*H*, ароматические *H*); 7,73 (т, 1*H*, $J=8$ Гц, H^7); 8,08 (д, 1*H*, $J=8$ Гц, H^5); 10,16 (с, 1*H*, *NH*). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 28,1; 46,3; 55,1; 113,9; 114,4; 114,6; 120,9; 122,8; 127,7; 131,6; 135,1; 140,1; 150,7; 155,4; 161,3; 164,9.

1-Метил-3-[2-[(4-этоксифенил)амино]]-2-оксоэтил]хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (2). Белое кристаллическое вещество, выход 65%, т.пл. 249-252 °С (ДМФА), R_f 0,78. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1,30 (т, 3*H*, $J=7$ Гц, CH_3); 3,30 (с, 3*H*, NCH_3); 3,97 (кв, 2*H*, $J=7$ Гц, OCH_2); 4,96 (с, 2*H*, CH_2); 6,84-6,88 (м, 2*H*, ароматические *H*); 7,35 (т, 1*H*, $J=8$ Гц, H^6); 7,36 (д, 1*H*, $J=8$ Гц, H^8); 7,44-7,48 (м, 2*H*, ароматические *H*); 7,73 (т, 1*H*, $J=8$ Гц, H^7); 8,07 (д, 1*H*, $J=8$ Гц, H^5); 10,22 (с, 1*H*, *NH*). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14,6; 28,1; 46,3; 63,1; 114,4 (2 *C*); 114,7; 120,9; 122,8; 127,7; 131,6; 135,1; 140,1; 150,8; 154,7; 161,3; 164,9.

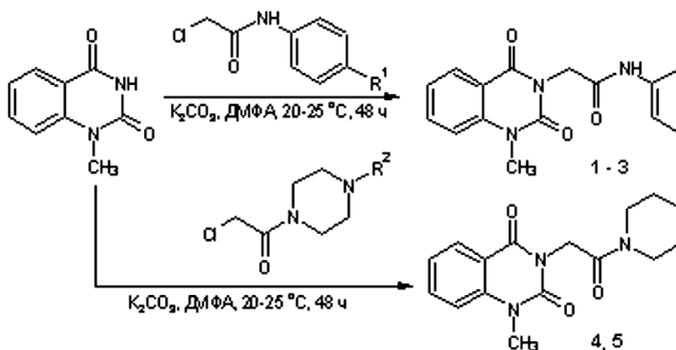
1-Метил-3-[2-[(4-нитрофенил)амино]]-2-оксоэтил]хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (3). Светло-желтое кристаллическое вещество, выход 61%, т.пл. 257-258 °С (этилацетат), R_f 0,68. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 3,31 (с, 3*H*, NCH_3); 5,06 (с, 2*H*, CH_2); 7,31 (т, 1*H*, $J=8$ Гц, H^6); 7,43 (д, 1*H*, $J=8$ Гц, H^8); 7,74 (т, 1*H*, $J=8$ Гц, H^7); 7,80-7,84 (м, 2*H*, ароматические *H*); 8,09 (д, 1*H*, $J=8$ Гц, H^5); 8,20-8,24 (м, 2*H*, ароматические *H*); 10,95 (с, 1*H*, *NH*). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 28,1; 46,6; 114,5; 114,6; 119,0; 122,9; 125,0; 127,8; 135,2; 140,0; 142,5; 144,6; 150,7; 161,2; 166,7.

1-Метил-3-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-оксоэтил]хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (4). Белое кристаллическое вещество, выход 56%,

т.пл. 162-165 °С (2-пропанол), R_f 0,63. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 2,21 (с, 3H, CH_3); 2,26-2,29 (м, 2H, пиперазин); 2,40-2,43 (м, 2H, пиперазин); 3,31 (с, 3H, NCH_3); 3,44-3,47 (м, 2H, пиперазин); 3,57-3,60 (м, 2H, пиперазин); 5,03 (с, 2H, CH_2); 7,23 (т, 1H, $J=8$ Гц, H^6); 7,27 (д, 1H, $J=8$ Гц, H^8); 7,69 (т, 1H, $J=8$ Гц, H^7); 8,04 (д, 1H, $J=8$ Гц, H^5). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 28,0; 41,5; 44,1; 44,5; 45,6; 54,2; 54,6; 114,44; 114,6; 122,6; 127,6; 135,0; 140,1; 150,6; 161,2; 164,4.

1-Метил-3-[2-(4-фенилпиперазин-1-ил)-2-оксоэтил]хиназолин-2,4(1H,3H)-дион (5). Светло-желтое кристаллическое вещество, выход 82%, т.пл. 222-225 °С (этанол), R_f 0,74. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 3,12-3,16 м (м, 2H, пиперазин); 3,27-3,31 (м, 2H, пиперазин); 3,33 (с, 3H, NCH_3); 3,59-3,63 (м, 2H, пиперазин); 3,75-3,79 (м, 2H, пиперазин); 5,12 (с, 2H, CH_2); 6,83 (т, 1H, $J=8$ Гц, H^6); 6,96-6,92 (м, 2H, ароматические H); 7,26-7,33 (м, 4H, ароматические H, H^8); 7,71 (т, 1H, $J=8$ Гц, H^7); 8,07 (д, 1H, $J=8$ Гц, H^5). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 28,0; 41,4; 44,0; 44,62; 48,2; 48,6; 114,5; 114,7; 115,9; 119,4; 122,7; 127,7; 129,0; 135,1; 140,2; 150,6; 150,7; 161,2; 164,6.

Результаты и обсуждение. Осуществлен синтез пяти новых ацетанилидных производных 1-метилхиназолин-2,4(1H,3H)-диона методом N-алкилирования в высокополярной среде безводного ДМФА. Алкилирующие агенты — замещенные амиды хлоруксусной кислоты были получены путем N-ацилирования соответствующих анилинов и производных пиперазина хлорацетилхлоридом в безводном хлороформе в присутствии пиридина [4].



Химическое строение полученных веществ подтверждено методами ЯМР- и ИК-спектроскопии. Продукты имеют узкий диапазон температуры плавления, соответственно, обладают высокой степенью чистоты, которую проверяли методом тонкослойной хроматографии. В настоящее время психотропные свойства полученных веществ исследуются в Научном центра инновационных лекарственных средств Волгоградского государственного медицинского университета.

Заключение. С помощью N-алкилирования пиримидиновых оснований открывается возможность использования хлорацетанилидов в качестве алкилирующих агентов в одном из вариантов получения N-замещенных производных. Полученные соединения могут быть перспективными в качестве фармакологически активных агентов, обладающих психотропными свойствами.

Список литературы

1. Rehm J., Hasan O.S.M., Black S.E., Shield K.D., Schwarzinger M. *Alzheimers Res. Ther.*, 2019, 11; DOI: 10.1186/s13195-018-0453-0.
2. Calcaterra N. E., Barrow J. C., *ACS Chem. Neuroscience*, 2014, 5, 4; DOI: 10.1021/cn5000056.
3. Келбышева Е.С., Телегина Л.Н., Ершова Е.А., Стрелкова Т.В., Езерницкая М.Г., Носова Э.В., Смольяков А.Ф., Долгушин Ф.М., Лойм Н.М. *Изв. АН, Сер. хим.*, 2017, 2; DOI: 10.1007/s11172-017-1735-6.
4. Озтюрк С., Окай С., Йылдырым А. *Изв. АН, Сер. хим.*, 2020, 11. DOI: 10.1007/s11172-020-3023-0.

УДК 544.77.022.84

*Васильева П.А., Дмитриева И.Б.
Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет,
Санкт-Петербург
polina.vasileva@spcpi.ru*

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ НА ПРОЦЕСС НАБУХАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Увеличение степени набухания растительного сырья способствует увеличению выхода экстрагируемых веществ. Данные биологически-активные вещества используются для разработки лекарственных форм. В работе, исследовано влияние электролитов (хлорида, иодида и рода-

ида натрия) на скорость и степень набухания растительной клетки на примере плодов софоры японской. Определено, что в концентрации 0,001 М растворы электролитов оказывают наибольшее влияние на процесс набухания измельченных плодов. Заметно улучшается набухания в присутствии иодида натрия.

Ключевые слова: степень набухания, константа набухания, электролиты, плоды софоры японской.

Vasilyeva P.A., Dmitrieva I.B.

*St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University,
St. Petersburg*

INFLUENCE OF ELECTROLYTES ON THE PLANT CELL SWELLING PROCESS

Increasing the swelling degree of plant materials contributes to increasing yield of extractable substances. These biologically active substances are used to development medications. In the work, influence of electrolytes (chloride, iodide and sodium thiocyanate) on the rate and degree swelling of a plant cell was studied using the example of Japanese Sophora fruits. It has been determined that electrolyte solutions at a concentration of 0.001 M have the greatest effect on the process of swelling of crushed fruits. Swelling is markedly improved in the presence of sodium iodide.

Keywords: *degree of swelling, swelling constant, electrolytes, fruits of Japanese Sophora.*

Биологически-активные вещества, получаемые из природного сырья, приобретают все большее значение в современном мире. В извлечениях из растительного сырья содержится комплекс активных веществ, которые могут иметь синергическое действие на организм. На основе растительного сырья получают экстракты, которые в дальнейшем используются как лекарственные препараты, биологически-активные добавки. Экстракты широко применяются как в фармацевтической, так и в косметической отрасли [1]. Например, плоды софоры японской содержат большое количество фенольных соединений, в частности флавоноидов [2]. Ранее в работе было определено, что плоды софоры японской, кроме флавоноидов, содержат: простые фенолы, полисахариды, сапонины (в частности, тритерпеновые), алкалоиды, дубильные вещества [3].

Увеличение выхода активных веществ из растительной клетки является актуальным, так как способствует более рациональному использованию природного материала. Одним из важных этапов

экстракции из растительного сырья является процесс набухания. Набухание — это самопроизвольный процесс поглощения полимером (или растительным сырьем) растворителя (или экстрагента). Процесс набухания сопровождается увеличением объема и массы растительного сырья [4].

Увеличение степени набухания способствует улучшению контакта сырья с растворителем, вследствие чего облегчается диффузия экстрагируемых веществ в раствор.

Набухание может иметь неограниченный и ограниченный характер. В первом случае набухание происходит непрерывно и в конечном счете, заканчивается растворением. Данный вид набухания характерен для линейных полимеров. Ограниченное набухание характеризуется степенью набухания, которая является количественной характеристикой данного процесса. Степень набухания, в этом случае, увеличивается при контакте с растворителем до максимально возможной.

Каркас растительной клетки состоит из высокомолекулярных веществ (целлюлозы, пектинов, лигнина), которые отвечают за процесс ограниченного набухания растительной клетки [5].

Известно, что на процесс набухания высокомолекулярных соединений влияет присутствие электролитов в растворе [6]. Таким образом, одним из способов воздействия на степень набухания растительного сырья может служить использование ионов.

Целью данной работы является определение влияния электролитов на процесс набухания лекарственного растительного сырья на примере плодов софоры японской.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) измельчить плоды софоры японской до оптимального размера, просеять с помощью сит;
- 2) выбрать ряд электролитов для оценки их влияния на процесс набухания;
- 3) определить концентрацию электролитов, которая будет соответствовать наилучшему набуханию плодов софоры японской;
- 4) провести набухание измельченных плодов в растворах электролитов;
- 5) определить степень набухания и построить зависимости степени набухания от времени;
- 6) сравнить полученные данные и сделать выводы.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были выбраны плоды софоры японской ТУ 9198-001-0145156605-16. Плоды

механически измельчали и просеивали при помощи сит с размером частиц: нижнее — 0,2 см, верхнее — 0,1 см.

В работе использовались растворы хлорида натрия концентрации 0,001 М, 0,01 М, 0,1 М; растворы иодида и роданида натрия концентрацией 0,001 М. Данные электролиты выбраны для оценки влияния анионов на процесс набухания исходя из того, что их можно поместить в один лиотропный ряд, а ион натрия является более индифферентным для оценки влияния на набухания растительного сырья. Для приготовления растворов использовались колбы на $50 \pm 0,10$ мл, в качестве растворителя использовалась вода дистиллированная.

$2 \pm 0,025$ г измельченных и просеянных плодов помещали в мерный цилиндр на $10 \pm 0,10$ мл. Добавляли $4 \pm 0,10$ мл раствора электролита нужной концентрации, фиксировали объем в начальный момент времени и через 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120 мин. Степень набухания рассчитывали по формуле:

$$\alpha_t = \frac{V_t - V_0}{V_0},$$

где V_t — объем, занимаемый частицами плодов софоры японской, в момент времени t ; V_0 — объем, занимаемый частицами плодов софоры японской, в начальный момент времени.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены зависимости степени набухания от времени для различных концентраций раствора хлорида натрия (NaCl).

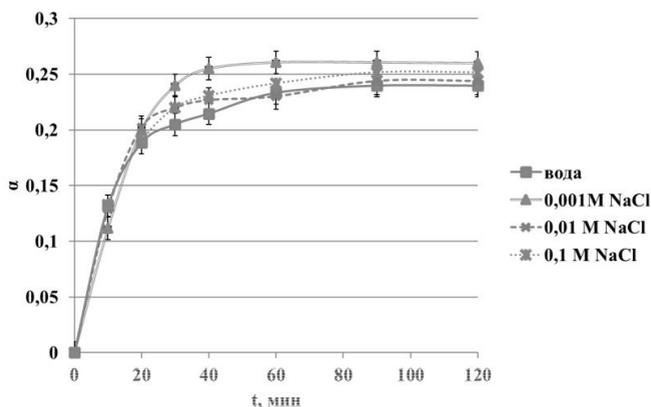


Рис. 1. Зависимость степени набухания плодов софоры японской от времени растворов натрия хлорида

В 0,001 М растворе хлорида натрия наблюдается лучшее набухание частиц софоры японской (максимальная степень набухания наибольшая для рассматриваемых случаев).

Таким образом, изучение влияния электролитов проводили при концентрации растворов 0,001 М. На рис. 2 представлены зависимости степени набухания от времени для растворов хлорида натрия, иодида натрия и роданида натрия.

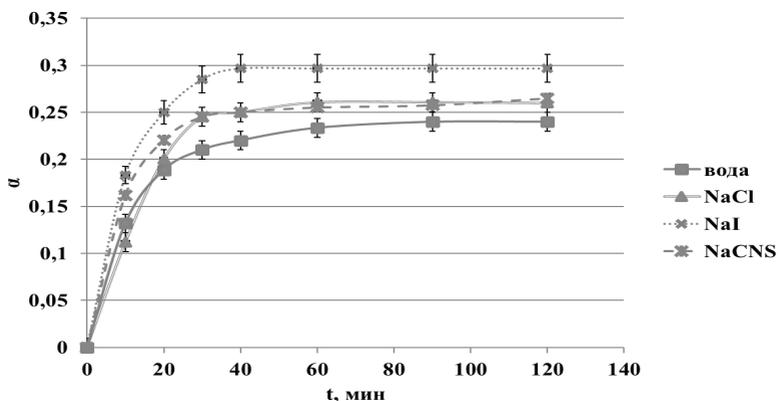


Рис. 2. Зависимость степени набухания плодов софоры японской в растворе электролитов от времени

Заключение. Было определено, что в растворах электролитов увеличивается максимальная степень набухания плодов софоры японской по сравнению с водой очищенной.

В концентрации 0,001 М происходит наилучшее набухание. Это объясняется достаточным количеством ионов в растворе для того, чтобы взаимодействовать с компонентами клетки, увеличивая ее гидрофильность.

В растворе натрия иодида максимальная степень набухания была наибольшей в рассматриваемых случаях. Ионы йода в меньшей степени оказывают влияние на высаливание растворов высокомолекулярных соединений, из которых состоит растительная клетка.

Список литературы

1. Chávez-González M.L. 1, Sepúlveda L., Kumar Verma D., Luna-García H.A., Rodríguez-Durán L.V., Aguilar A.I.C.N. Conventional and Emerging Extraction Processes of Flavonoids // Processes. 8. 2020. p. 434 <https://doi.org/10.3390/pr8040434>.
2. Охременко О.С. Амперометрическое определение антиоксидантной активности флавоноидов в различных извлечениях, полученных из плодов софоры японской // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2006. № S23. С. 27-28.
3. Васильева П. А. Определение биологически-активных веществ в извлечении из плодов софоры японской и плодов боярышника // Молодая фармация — потенциал будущего: Сборник материалов XII всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием. 2022. С. 90-94.
4. Котлярова И.А., Степина И.В. Кинетика набухания древесины сосны, модифицированной аминборатами // Вестник Белгородского государственного технологического университета им. В.Г. Шухова. 2018. № 3. С. 81-88.
5. Garat W. Le Moigne, N. 1, Corn S., Beaugrand J., Bergeret A. Swelling of Plant Fibers under Hygro/Hydrothermal Conditions: Determination of Hygro/Hydroexpansion Coefficients *Processus de Gonflement des Fibres Végétales en Conditions Hygro/Hydrothermiques: Détermination des Coefficients d'Hygro/Hydroexpansion* // *Revue des Composites et des Matériaux Avancés*. 2019. Vol. 29. No. 4. P. 225-232.
6. 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.

УДК 615-074

Вергун О.М.

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Беларусь
vot_v@tut.by*

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРАКТИКЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Публикация посвящена описанию подходов для количественной оценки наличия лекарственных веществ в различных растворах. Количественные методы анализа в химии выражены последовательностью экспериментальных способов, которые определяют в образце материала, что исследуется, содержание (концентрация) отдельных составляющих и примесей.

***Ключевые слова:** методы: абсолютной градуировки; внутреннего стандарта; эталонной добавки с внутренним стандартом.*

Viarhun O.M.

*EE «Belarusian State Medical University»,
Minsk, Belarus*

METHODOLOGICAL APPROACHES FOR QUANTITATIVE ASSESSMENT OF DRUGS IN THE PRACTICE OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS

The publication is devoted to describing approaches for quantitative assessment of the presence of medicinal substances in various solutions. Quantitative methods of analysis in chemistry are expressed as a sequence of experimental methods that determine in a sample of the material that is being studied, the content (concentration) of individual components and impurities.

***Keywords:** methods: absolute calibration; internal standard; reference additive with internal standard.*

Количественный анализ — это раздел аналитической химии, который занимается определением компонентов тестируемого соединения или смеси. [1]. Методы, используемые в этом виде анализа, можно разделить на две основные группы: классические и инструментальные. В случае классических методов, также известных как химические, требуются различные реакции, и определение выполняется с использованием масс или объемов. Инструментальные ме-

тоды позволяют использовать измерительные приборы, использующие зависимость различных физических и химических величин от концентрации анализируемого вещества.

В задачи качественного анализа входит: установление присутствия (обнаружение, открытие) в пробе тех или иных компонентов (лекарственных средств, наркотических или психотропных веществ), оценка их количественного содержания в образце [2].

Деление химического анализа на качественный анализ и количественный анализ в определенной степени условно. Если компонент не обнаружен в пробе, то его содержание ниже некоторого предела, ограничиваемого используемым методом. Когда состав анализируемой пробы неизвестен, сначала проводят качественный анализ и только после этого приступают к количественным измерениям. Качественный и количественный анализ проводят химическими, инструментальными (физическими и физико-химическими) или биологическими методами [2].

Метод абсолютной градуировки заключается в построении графической зависимости одного из количественных параметров любого отклика аналитического сигнала от содержания вещества в пробе.

Зависимость отклика аналитического сигнала определяемых веществ от их концентраций в растворе (C_i) выражают линейным уравнением вида $y = bx$ (т.е. измерения проводят для концентраций веществ, которые отвечают линейному диапазону работы прибора). Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей (b) выполняется каждый раз после установки, настройки и ремонта оборудования или после длительного перерыва в измерениях (более 1 месяца).

Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей выполняется по методу наименьших квадратов, используя для расчета отклики приборов, которые получают при измерении градуировочных растворов с заданными концентрациями определяемых веществ. Градуировочные растворы подвергаются исследованию в тех же условиях, что и исследуемые пробы. Количество уровней концентраций вещества — не менее 5. Для каждой концентрации определяемого вещества проводят не менее 2 измерений. Угловой коэффициент линейной зависимости ($y = bx$) вычисляется по формуле 1:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M C_i \cdot S(H)_i}{M \cdot \sum_{i=1}^N (C_i)^2} \quad (1),$$

где:

N — количество растворов разной концентрации ($N \geq 5$);

M — количество измерений каждого раствора ($M \geq 2$);

C_i — концентрация определяемого вещества в i -том растворе;

$S(H)_i$ — показания анализатора для вещества из i -го раствора.

Для полученного углового коэффициента линейной зависимости выполняется проверка коэффициента аппроксимации R^2 , который определяется следующим выражением (2):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (S(H)_i - b \cdot C_i)^2}{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \left(S(H)_i - \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M S(H)_i}{N \cdot M} \right)^2} \quad (2)$$

Коэффициент аппроксимации линейной зависимости считают удовлетворительным если: $R^2 \geq 0,990$.

Если R^2 получился менее 0,990, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, принимают меры по их устранению или переходят к использованию метода внутреннего стандарта (там, где это возможно). Угловой коэффициент линейной зависимости (b) и его коэффициент аппроксимации (R^2) также могут быть

рассчитаны программным обеспечением оборудования или в среде EXCEL.

Недостатки метода абсолютной калибровки: трудоемкость; точность дозирования пробы; обязательное наличие большого числа чистых исследуемых соединений; отсутствие учета влияния других компонентов, присутствующих в пробе, на параметры пика (отклика) исследуемого соединения.

Метод внутреннего стандарта основан на том, что к анализируемой смеси добавляют определенное количество вещества, которое не входит в состав анализируемой смеси, близкого по физико-химическим свойствам к определяемым веществам и параметры которого не перекрывается ни с одним из исследуемых компонентов. Определяется величина отношения показателей анализатора исследуемого компонента и введенного стандарта. Предварительно рассчитывается и строится график отношений аналитических сигналов различных концентраций искомого вещества к аналитическому сигналу внутреннего стандарта. Для расчета концентрации анализируемого компонента используется предварительно полученная градуировочная зависимость.

Зависимость отношения аналитических сигналов определяемых веществ к аналитическому сигналу внутреннего стандарта ($S(H)_i / S(H)_{cm}$) от отношения их концентраций в растворе (C_i / C_{cm}) выражают линейным уравнением вида $y=bx$ (т.е. измерения проводят для концентраций веществ, которые отвечают линейному диапазону работы прибора). Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей (b) выполняется каждый раз после установки, настройки и ремонта прибора или после длительного перерыва в измерениях (более 1 месяца), а также в случае, когда результат контроля качества процедуры измерений признан неудовлетворительным.

Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей выполняется по методу наименьших квадратов, используя для расчета отношения площадей (высот) пиков, которые получают при измерении градуировочных растворов с заданными концентрациями определяемых веществ и внутреннего стандарта. Калибровочные растворы подвергаются исследованию в тех же условиях, что и исследуемые пробы. Количество уровней концентраций вещества — не менее 5. Для каждой концентрации определяемого вещества проводят не менее 2 измерений. Угловой коэффициент линейной зависимости ($y=bx$) вычисляется по формуле 3:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \frac{C_i}{C_{cm}} \cdot \frac{S(H)_{ij}}{S(H)_{cmij}}}{M \cdot \sum_{i=1}^N \left(\frac{C_i}{C_{cm}} \right)^2} \quad (3),$$

где:

- N — количество растворов разной концентрации ($N \geq 5$);
- M — количество измерений каждого раствора ($M \geq 2$);
- C_i — концентрация определяемого вещества в i -том растворе;
- $C_{\bar{w}}$ — концентрация стандартного вещества;
- $S(H)_{ij}$ — аналитический сигнал определяемого вещества при исследовании i -го раствора;
- $S(H)_{\bar{w}ij}$ — аналитический сигнал стандартного вещества при исследовании j -го измерения i -го раствора.

Для полученного углового коэффициента линейной зависимости выполняется проверка коэффициента аппроксимации R^2 , который определяется следующим выражением (4):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \left(\frac{S(H)_{ij}}{S(H)_{cmij}} - b \cdot \left(\frac{C_i}{C_{cm}} \right) \right)^2}{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \left(\frac{S(H)_{ij}}{S(H)_{cmij}} - \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \frac{S(H)_{ij}}{S(H)_{cmij}}}{N \cdot M} \right)^2} \quad (4)$$

Коэффициент аппроксимации линейной зависимости считают удовлетворительным, если: $R^2 \geq 0,990$. Если R^2 получился менее 0,990, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

Требования, предъявляемые к внутреннему стандарту: стандартное вещество должно полностью растворяться в анализируемой смеси; стандартное вещество должно быть близким по физико-химическим свойствам с анализируемым веществом; отклик определяемого вещества и стандартного вещества должны быть близкими (не отличаться более чем в десять раз);

Преимущества метода внутреннего стандарта: нет необходимости дозирования строго заданных количеств пробы и соблюдения постоянства всех параметров прибора; возможность в каждом проводимом определении контролировать потери аналитов в процессе подготовки пробы.

Недостатки: процедуры взятия дополнительных навесок и перемешивания — источник дополнительных погрешностей; трудности при выборе стандарта; при наличии существенных различий в составах матриц градуировочной серии растворов и реальных исследуемых образцов предварительно определяется процент выхода определяемых веществ из матриц (например, кровь или моча) этих образцов (усредненное значение из 8-10 проб).

Метод эталонной добавки с внутренним стандартом используется главным образом при анализе объектов, имеющих сложный химический состав, в которых поведение исследуемого аналита (вещества) определяется преимущественно характеристиками самого объекта (матрицы), его способностью к поддержанию различного рода побочных процессов (комплексообразование, сорбция, солевой эффект и т.п.). Из-за протекания этих процессов, результат анализа может определяться составом матрицы в гораздо большей степени, чем содержанием в ней аналита (два объекта с одинаковым содержанием аналита, но разным составом матрицы, могут давать аналитические сигналы совершенно разной величины).

Метод эталонной добавки, позволяющий учесть влияние матрицы, заключается в том, что к анализируемой смеси несколько раз добавляют различные *известные* количества того компонента (в чистом виде), содержание которого следует определить. По полученным данным строится график зависимости аналитического сигнала от величины добавки. Содержание компонента в исходной анализируемой смеси соответствует величине аналитического сигнала, определяемой экстраполяцией на нулевую добавку.

Основная цель метода эталонных добавок — обеспечение максимально точного соответствия условий градуировки и собственно определения. При использовании данного метода эти две операции совмещаются. Необходимым условием при этом является постоянство матричного эффекта при изменении концентрации аналита, т.е. при внесении добавки влияние матричного эффекта и линейность показаний прибора не должны нарушаться (если количество добавки значительно превышает количество аналита в пробе, то результат анализа приобретает большую случайную ошибку и повышается вероятность систематической ошибки).

Заключение. Предлагаемые методические подходы позволят применять количественную оценку лекарственных средств или примесей в различных растворах или субстанциях, не расходуя времени на поиск какой либо дополнительной специальной литературы, поскольку описаны основные методы количественного определения, применительно к любому аналитическому оборудованию без использования стандартных образцов сравнения.

Список литературы

1. СТБ ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений, ч.1-6.
2. Канарская О.К., Александров П.А. Экспертиза наркотических средств, получаемых из мака и конопли. Методические рекомендации. Минск: ГЭКЦ МВД Беларуси, 2009
3. Винарский В.А. Хроматография [Электронный ресурс]: Курс лекций в двух частях: Часть 1. Газовая хроматография. Электрон. текст. дан. (4,1 Мб). Мн.: Научно-методический центр «Электронная книга БГУ», 2003. Режим доступа:<http://anubis.bsu.by/publications/elresources/Chemistry/vinarski.pdf>. Электрон. версия печ. публикации, 2002. PDF формат, версия 1.4 . № гос. регистрации 1200300210.
4. Количественный газохроматографический анализ: Методические указания к выполнению лабораторной работы по курсу физико-химических методов анализа / Сост. В.Ф. Апраксин. СПб.: СПХФА, 1999. 12 с.
5. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. М.: Мир, 1989. 608 с

УДК 577.334

*Горобец М.Г.¹, Бычкова А.В.¹, Абдуллина М.И.¹,
Мотякин М.В.^{1,2}*

*¹ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля»
Российской академии наук,
Москва*

*²Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семенова Российской академии наук,
Москва
maria.g.gorobets@gmail.com*

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ КРОВИ НА ПЕРОКСИДАЗОПОДОБНЫЕ СВОЙСТВА МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ

Показано снижение пероксидазоподобной активности магнитных частиц (МНЧ) при добавлении человеческого сывороточного альбумина, иммуноглобулина G, при добавлении гемоглобина имеет место снижение и повышение пероксидазоподобной активности МНЧ, зависящее от концентрации белка. Оценено изменение пероксидазоподобных свойств МНЧ при формировании гибридных наносистем различного состава.

***Ключевые слова:** сывороточный альбумин, наночастицы оксида железа, магнитные наночастицы, гемоглобин, иммуноглобулин G, гибридные наносистемы.*

*Gorobets M.G.¹, Bychkova A.V.¹, Abdullina M.I.¹,
Motyakin M.V.^{1,2}*

*¹Emanuel Institute of Biochemical Physics
of Russian Academy of Sciences,
Moscow*

*²N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian
Academy of Sciences, Moscow*

INFLUENCE OF THE BLOOD PROTEINS ON PEROXIDASE-LIKE PROPERTIES OF MAGNETIC NANOPARTICLES

It was shown a decrease of peroxidase-like properties of magnetic nanoparticles (MNPs) after addition of human serum albumin and immunoglobulin G to the reaction mixture, while addition of hemoglobin leads to an increase and decrease of peroxidase-like activity of MNPs depending on the protein concentration. The change in the peroxidase-like properties of MNPs due to formation of hybrid nanosystems of various composition was assessed.

***Keywords:** serum albumin, iron oxide nanoparticles, magnetic nanoparticles, hemoglobin, immunoglobulin G, hybrid nanosystems.*

Магнитные наночастицы (МНЧ) оксидов железа в течение последних десятилетий активно применяются в исследованиях, нацеленных на создание функциональных биомедицинских материалов для целевой доставки лекарственных веществ, магнитной гипертермии, магнитной сепарации, магнитно-резонансной томографии и др. [1, 2]. В физиологических условиях магнитные частицы способны катализировать образование активных форм кислорода (АФК) (пероксидазоподобная активность). В силу наличия данной активности системы на основе МНЧ могут обеспечивать ферроптоз клеток, что находит применение в лечении опухолей [3].

В то же время одной из проблем использования МНЧ в составе лекарственных средств является их ограниченная биосовместимость, распространённым способом повышения биосовместимости выступает создание на поверхности МНЧ покрытий, состоящих из белков. В число данных белков входит сывороточный альбумин (бывший и человеческий) [4], а также иммуноглобулины G, обеспечивающие возможность нацеливания наночастиц на биологические мишени по механизму «антиген-антитело» *in vivo* [5] и применяющиеся в различных аспектах иммуносорбции, биохимических анализов и т.д. [2].

Данная работа нацелена на оценку влияния белкового покрытия на поверхности МНЧ на детектируемые пероксидазоподобные свойства МНЧ.

В работе использовали МНЧ оксидов железа, синтезированные и электростатически стабилизированные по описанной ранее методике [6]. Белки (человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), иммуноглобулин G (IgG), гемоглобин (Hb)) адсорбировали на поверхности МНЧ. Оценка пероксидазоподобных свойств МНЧ осуществлялась при помощи добавления к раствору, содержащему МНЧ или МНЧ+белок, пероксида водорода и орто-фенилендиамина (о-ФДА), образующего при взаимодействии с гидроксильными радикалами окрашенный продукт — 2,3-диаминофеназин (ДАФ) с максимумом поглощения при 418-455 нм [7]. По тангенсу угла наклона начального участка роста оптической плотности ДАФ рассчитывалась скорость образования продукта в реакции, расчет проводился с использованием коэффициента экстинкции $13000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [8].

При присутствии в исследуемом растворе белков (ЧСА, IgG) отмечено понижение скорости образования ДАФ (рис. 1), предполо-

жительно обусловленное снижением пероксидазоподобной активности МНЧ. Вероятными причинами данного эффекта могут быть:

- перехватывание молекулами белков гидроксильных радикалов, генерируемых на поверхности МНЧ из пероксида водорода;
- взаимодействие белков с молекулами о-ФДА и/или ДАФ, влияющее на окислительную реакцию;
- экранирование поверхности МНЧ адсорбированными молекулами белка.

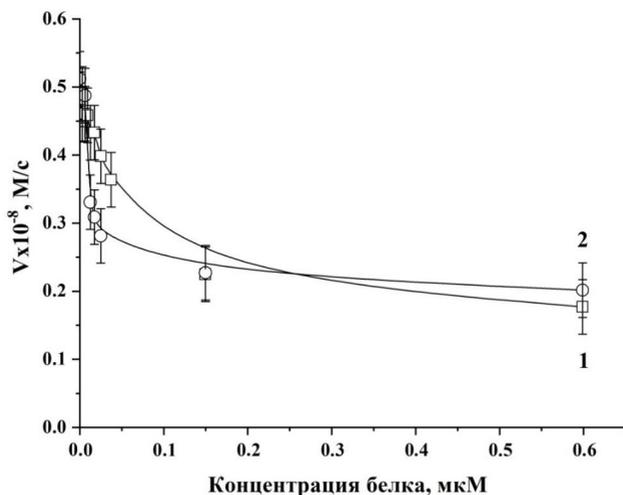


Рис. 1. Зависимость скорости образования ДАФ от концентрации альбумина (1) и иммуноглобулина G (2). $C(\text{МНЧ})=0,16$ нМ; $C(\text{H}_2\text{O}_2)=9,8$ мМ; $C(\text{о-ФДА})=0,075$ мМ; 37°C

Стоит сказать, что в случае добавления иммуноглобулина G наблюдается более резкое падение скорости генерации ДАФ в сравнении с добавлением ЧСА, данное различие может быть обусловлено отличиями в структуре и молекулярной массе добавленных белков.

С целью оценки возможностей восстановления пероксидазоподобной активности поверхности МНЧ нами были проведены работы по многократной магнитной separации систем состава МНЧ+ЧСА, продемонстрировавшие устойчивости эффекта тушения при добавлении ЧСА (после 5-кратной магнитной separации способность вовлекаться в процесс генерации АФК у систем, в которые был до-

бавлен ЧСА была ниже, чем у аналогичных систем, в которых отсутствовал ЧСА).

При добавлении гемоглобина наблюдаются эффекты, отличные от эффектов ЧСА и IgG (рис. 2).

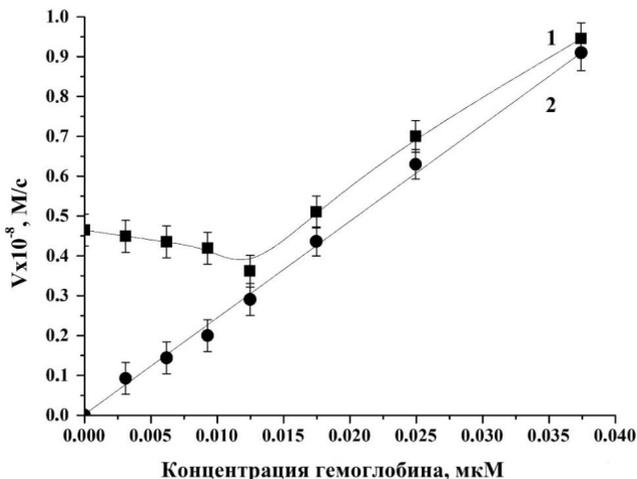


Рис. 2. Зависимость скорости образования ДАФ от концентрации гемоглобина в присутствии магнитных наночастиц (1) и их отсутствии (2). $C(\text{МНЧ})=0,16$ нМ; $C(\text{H}_2\text{O}_2)=9,8$ мМ; $C(\text{o-ФДА})=0,075$ мМ; 37°C

При концентрации Нб менее 10 нМ не показано значимого изменения пероксидазоподобной активности МНЧ в присутствии Нб. При введении Нб в концентрации от 12,5 до 37,0 нМ в исследуемый раствор детектируется повышение скорости образования ДАФ, предположительно обусловленное участием гемовой группы в составе гемоглобина в процессе разложения пероксида водорода и, соответственно, генерации дополнительного количества АФК. Повышение скорости образования ДАФ наблюдается и в растворе чистого Нб при повышении концентрации Нб. Значение скорости системы МНЧ+Нб ниже, чем суперпозиция скоростей растворов содержащих МНЧ и Нб соответствующей концентрации, что приводит нас к заключению, что может иметь место экранирование поверхности МНЧ адсорбированными молекулами Нб, снижающее скорость генерации в ДАФ пероксидазоподобной реакции.

Таким образом, характер влияния образующегося покрытия на пероксидазоподобные свойства МНЧ определяются структурой и особенностями белков, их концентрацией в растворе и условиями реакции. В нашей работе были использованы малые концентрации белков, позволяющие также анализировать особенности формирования адсорбционного слоя белковых молекул на поверхности МНЧ. Так, установлено, что в присутствии всех белков (ЧСА, Ig) пероксидазоподобная активность МНЧ уменьшается, добавление Нб в реакционную смесь приводит к снижению или увеличению детектируемой генерации радикалов в зависимости от количества белка.

Мы предполагаем, что причиной снижения пероксидазоподобной активности МНЧ в растворах является эффект экранирования белками поверхности МНЧ (в случае ЧСА, IgG), приводящий к снижению активности частиц в реакциях генерации гидроксильных радикалов, может применяться при создании гибридных белок-содержащих покрытий на МНЧ для терапии опухолей. Нами была проведена оценка пероксидазоподобных свойств МНЧ после формирования на их поверхности покрытий из ЧСА в рамках работ по получению гибридных наносистем для биомедицинских применений. Так, было показано, что при использовании оригинального свободнорадикального способа закрепления покрытий из ЧСА на поверхности МНЧ (рис. 3) пероксидазоподобная активность частиц сохраняется в течение более 7 дней [9]. Результаты для гибридных

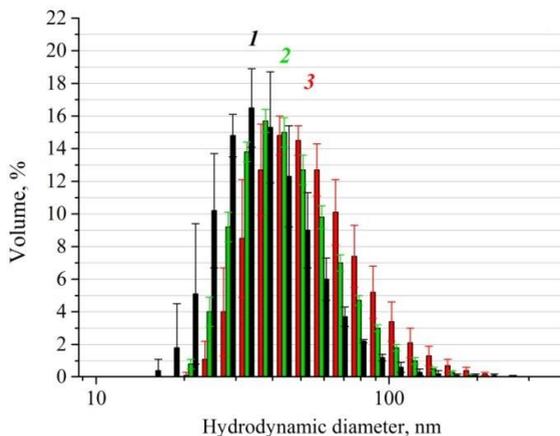


Рис. 3. Распределение гидродинамических размеров в образцах следующего состава: 1 — МНЧ; 2 — МНЧ+ЧСА; 3 — МНЧ+ЧСА+H₂O₂

наносистем с остатком фолиевой кислоты на поверхности также свидетельствуют об остаточных пероксидазоподобных свойствах.

Работы по созданию покрытий из ЧСА на МНЧ проводятся за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10150, <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>.

Список литературы

1. Magnetic nanoparticles / S. Savliwala, A. Chiu-Lam, M. Unni, A. Rivera-Rodriguez, E. Fuller, K. Sen, M. Threadcraft, C. Rinaldi. Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications // Chung E.J., Leon L., Rinaldi C., editors Amsterdam: Elsevier. 2019. P. 195–221.

2. Многофункциональные биосовместимые покрытия на магнитных наночастицах / А.В. Бычкова, О.Н. Сорокина, М.А. Розенфельд, А.Л. Коварский // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 11. С. 1026-1050.

3. Gao L., Fan K., Yan X. Iron oxide nanozyme: A multifunctional enzyme mimetic for biomedical applications // Theranostics. 2017. V. 7. N. 13. P. 3207-3227.

4. Chubarov A.S. Serum Albumin for Magnetic Nanoparticles Coating // Magnetochemistry. 2022. V. 8 (2). N. 13. P. 1-18.

5. Targeted Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Early Detection of Cancer: Possibilities and Challenges // Z. Bakhtiary, A.A. Saei, M.J. Hajipour, M. Raoufi, O. Vermesh, M. Mahmoudi // Nanomedicine Nanotechnology. Biol. Med. 2016 V. 12. N. 2. P. 287–307.

6. Гибридные, биodeградируемые нанокomпозиты на основе биополиэфирной матрицы и магнитных наночастиц оксида железа: структурные, магнитные и электронные характеристики // В.Е. Прусаков, Ю.В. Максимов, К.Н. Нищев, А.В. Голубьев, В.И. Беглов, Ю.Ф. Крупянский, А.В. Бычкова, А.Л. Иорданский, А.А. Берлин // Химическая физика. 2018. Т. 37. №1. С. 83-90.

7. Высокоэффективная тест-система для определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови человека // Ю.А. Григоренко, Д.И. Метелица, Н.В. Пивень, Л.Н. Лухверчик, О.И. Шадыро // Биомедицинская химия. 2009. Т. 55. № 3. С. 350-360.

8. Fu P.K.-L., Abuzakhm S., Turro C. Photoinduced DNA cleavage and cellular damage in human dermal fibroblasts by 2,3-Diaminophenazine // Photochemistry and Photobiology. 2005. V. 81. P. 89-95.

9. Albumin-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles for Theranostics: Engineering and Long-Term In Situ Imaging // A. V. Bychkova, M. N. Yakunina, M. V. Lopukhova, Y. N. Degtyarev, M. V. Motyakin, V. S. Pokrovsky, A. L. Kovarski, M. G. Gorobets, V. M. Retivov, D. S. Khachatryan // Pharmaceutics. 2022. V. 14. N. 12. 2771.

УДК 547.94

*Дадали В.А., Соколова Е.А., Степанова Н.П.,
Антонова Ж.В., Быкова Д.И.*
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург
vdadali@mail.ru; Elena.Sokolova@szgmu.ru;
Natalya.Stepanova@szgmu.ru;
Zhanna.Antonova@szgmu.ru; dashapink3@gmail.com

ТРОПАНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ ФИЗАЛИСА СЕМЕЙСТВА ПАСЛЕНОВЫХ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

В работе проведен анализ алкалоидов тропанового ряда в экстрактах плодов и чехликов физалиса овощного (2023 г., Колумбия) и физалиса декоративного (2022 г., Лен. область) методом тонкослойной хроматографии в присутствии свидетеля атропина с использованием реактива Драгендорфа по Мунье. В экстракте чехликов физалиса декоративного идентифицирован атропин (\pm гиосциамин).

Ключевые слова: тропановые алкалоиды, атропин, гиосциамин, скополамин, физалис, тонкослойная хроматография.

*Dadali V.A., Sokolova E.A., Stepanova N.P.,
Antonova Zh.V., Bykova D.I.*
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg

TROPANE ALKALOIDS OF PHYSALIS OF THE SOLANACEAE FAMILY OF ST. PETERSBURG AND THE LENINGRAD REGION

The analysis of tropane alkaloids in extracts of fruits and sepals of vegetable physalis (2023, Colombia) and physalis decorative (2022, Leningrad region) was carried out in the work by thin-layer chromatography in the presence of an atropine standard using a Dragendorff –Munier reagent. Atropine (\pm hyoscyamine) was identified in the extract of sepals of physalis decorative.

Keywords: tropane alkaloids, atropine, hyoscyamine, scopolamine, physalis, thin-layer chromatography.

Актуальность. Род физалиса (*Physalis*) относится к семейству пасленовых (*Solanaceae*, порядок пасленоцветные (*Solanales*)), включает 86 подтвержденных видов и 123 таксона, ожидающих подтверждения.

Плоды съедобного овощного физалиса (*Physalis peruviana L.*) обладают рядом полезных свойств: антиоксидантных, гипогликемических, антиканцерогенных, антибактериальных, обусловленных присутствием полифенолов, витанолидов, каротиноидов, водо- и жирорастворимых витаминов [1, 2]. Основным поставщиком овощного физалиса (*Physalis peruviana L.*) является Колумбия. В Государственный реестр РФ включены 15 видов физалиса. Наиболее распространен в России физалис обыкновенный (*Physalis alkekengi L.*), который выращивается как декоративное растение в садах и на дачных участках. В экстрактах декоративного физалиса обнаружены витанолиды (физалины), флавоноиды и их гликозиды, минеральные компоненты (катионы натрия, калия, кальция, магния, цинка, марганца, меди, железа, свинца, кадмия, хрома), витамины, терпеноиды. Наряду с полезными компонентами в физалисе обнаружены пигменты и токсичные алкалоиды тропанового ряда [3, 4], качественное и количественное содержание которых зависит от региона и климатических условий произрастания. Это диктует необходимость выбора эффективного метода их обнаружения и мониторинга в различных частях растений.

Цель исследования: используя метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), проанализировать содержание тропановых алкалоидов в растениях рода физалиса семейства пасленовых, доступных в Санкт-Петербурге и произрастающих в Ленинградской области.

Введение. Тропановые алкалоиды (ТА) являются метаболитами различных видов растений семейств пасленовых (*Solanaceae*), реже других семейств: вьюнковых (*Convolvulaceae*) и эритроксиловых (*Erythroxylaceae*) [4]. По химической природе тропановые алкалоиды относятся к группе третичных азотистых оснований или четвертичных N-оксидов или солей. Родоначальной структурой этой группы является 8-азабицикло[3,2,1]октан, N-метильное производное которого получило название тропан (см. рис. 1).

N-метильная группа в положении 8 отсутствует у погпроизводных — калистегинов, обладающих высокой токсичностью [5, 6]. Выделено и описано свыше 250 соединений, относящихся к тропановым алкалоидам, из них наиболее распространены растительные алкалоиды группы атропина. Эти соединения синтезируют

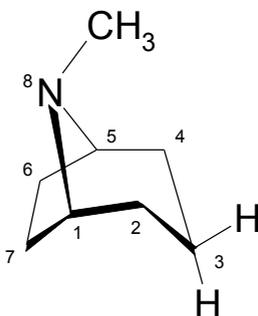


Рис. 1. Тропан, или 8-азабицикло[3,2,1]октан

ются в растениях из L-орнитина и L-аргинина через промежуточное образование N-метилпиролиниум-катиона (1), превращающегося далее в тропан-3-он (тропинон) (2). Тропинон восстанавливается ферментами тропинон редуктазой I до тропина (3) с аксиальным (α) расположением спиртовой группы или тропинон редуктазой II с образованием псевдотропина (ψ -тропина, (4)) с экваториальным (β) расположением гидроксильной группы в положении 3. Соответственно выделяют две группы тропановых алкалоидов 3 α - и 3 β -гидрокси-тропанов (см. рисунок 2). Соединения (3) и (4) далее гидроксилируются и этерифицируются. В этерификации спиртовых групп принимают участие более 30 кислот с образованием моно-, ди- и триэфиров: муравьиная, уксусная, гликолевая, изомасляная, фенилмолочная, троповая, бензойная и другие.

Наиболее изучены α -ТА группы атропина: (-)-гиосциамин ($C_{17}H_{13}NO_3$) (5), атропин (\pm гиосциамин), скополамин ($C_{17}H_{21}NO_4$) (6), апоатропин ($C_{17}H_{12}NO_2$) (7), определяемые в растениях семейства пасленовых (*Solanaceae*), произрастающих в различных регионах, в том числе и на северо-западе России (см. рисунок 3). В растениях содержится, главным образом, (-)-гиосциамин, который в процессе выделения и анализа рацемизируется с образованием атропина.

Для определения тропановых алкалоидов используются различные методы их извлечения, очистки, качественного и количественного анализа [7, 8]. В процессе пробоподготовки алкалоиды переводят в соли, экстрагируют в кислой среде, затем подщелачивают растворы для перевода ТА в форму основания и экстрагируют органическими растворителями. Процесс пробоподготовки в среднем занимает от 2 до 24 часов.

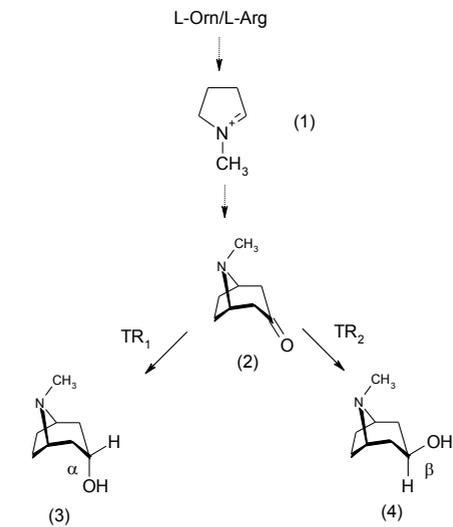


Рис. 2. Биосинтез тропановых алкалоидов

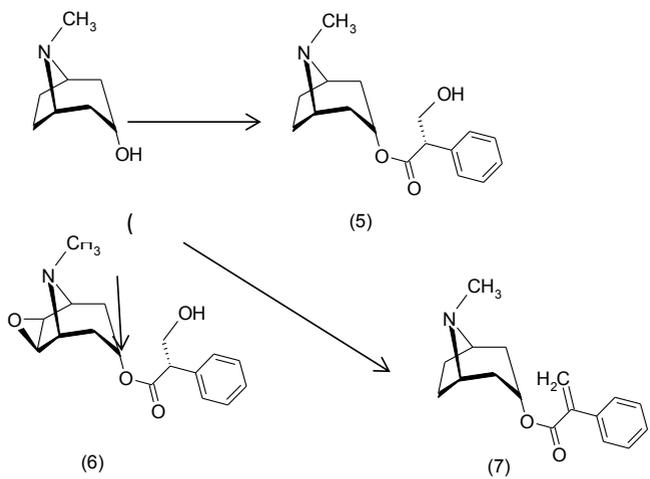


Рис. 3. Тропановые алкалоиды растений семейства пасленовых (*Solanaceae*)

В качестве методов определения используют перманганатометрию (РФ, Великобритания, страны ЕС), хромато-масс-спектрометрию, высокоэффективную жидкостную хроматографию со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием (РФ, ЕС), а также газовую хроматографию (РФ, Япония) и капиллярный электрофорез (Бельгия). Для определения оптических изомеров алкалоидов используются циклодекстрины в качестве хиральных селекторов [8].

Материалы и методы исследования. В данной работе исследовались возможности экспресс-определения ТА методом ТСХ в овощном (Колумбия) и декоративном (Ленинградская область) физалисе (см. рис. 4).



Рис. 4. Слева — физалис декоративный (Лен. обл.).
Справа — физалис овощной (Колумбия)

В литературе представлено аналогичное исследование ТА в различных образцах *Atropa belladonna* [9].

Экстракция алкалоидов. Растворители для экстракции: водный аммиак, хлороформ, петролейный эфир, раствор лимонной кислоты. Высушенные на воздухе части растения измельчали в ступке в 40%-ном растворе лимонной кислоты. Через 4 часа полученный экстракт (рН=1) фильтровали и добавляли водный 25%-ный раствор аммиака до рН=9. Алкалоиды экстрагировали хлороформом

(10 мл × 3). Органический экстракт промывали водой и фильтровали через слой прокаленного сульфата натрия.

Тонкослойная хроматография ТСХ. Растворители для тонкослойной хроматографии (ТСХ): ацетон: 10%-ный водный аммиак (95:5), хлороформ, петролейный эфир ($T_{\text{кип}}=40-70^{\circ}\text{C}$), серная кислота. Пластины для ТСХ: «Silufol» (Чехия); НРТLC-Fotigplatten RP-18 für die Nano-DC, 10×10 см (Merck, Darmstadt, Germany); Silica Gel 60 F₂₅₄, 2,5×7,5 см (Merck, Darmstadt, Germany); «Sorbfil», СТХ-1А, ПЭТФ, 10×10 см (ЗАО «Сорбполимер», г. Краснодар). В качестве свидетеля использовали атропин в виде основания.

Проявление хроматограмм. Пластины проявляли йодом, алкалоиды окрашивали реактивом Драгендорфа по Мунье.

Результаты и их обсуждение. Методом ТСХ исследовали экстракты четырех образцов физалиса: (1) плодов и (2) чехликов из сросшихся чашелистиков физалиса овощного (2023 г., Колумбия); (3) плодов и (4) чехликов из сросшихся чашелистиков физалиса декоративного (2022 г., Лен. область). Наилучшие результаты разделения компонентов экстрактов достигнуты на пластинах НРТLC-Fotigplatten RP-18 für die Nano-DC, 10x10 см (Merck, Darmstadt, Germany) для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с обращенной фазой при использовании системы элюентов ацетон : 10%-ный водный аммиак (95:5). Метод ВЭТСХ характеризуется более высокой чувствительностью по сравнению с другими методами планарной ТСХ. При проявлении хроматографических пластин в экстрактах (1)-(4) обнаружены от 5 до 8 компонентов (см. табл. 1).

Хроматограммы обрабатывали реактивом Драгендорфа по Мунье. В результате наблюдали оранжевое окрашивание компонента со значением $R_f=0,70$ в экстракте (4) чехликов физалиса декоративного, собранного в Ленинградской области в 2022 г. Наличие тропанового алкалоида атропина (\pm гиосциамин) в этой фракции было подтверждено данными хроматографии с использованием свидетеля с $R_f=0,72$ (оранжевое окрашивание реактивом Драгендорфа по Мунье). Компоненты с таким же значением R_f обнаружены и в других экстрактах, однако подобного оранжевого окрашивания не наблюдалось, что свидетельствует либо об отсутствии алкалоидов, либо их незначительном содержании, ниже чувствительности цветной реакции.

Таким образом, алкалоид тропанового ряда обнаружен в экстракте чехликов физалиса декоративного, произрастающего на

территории Ленинградской области. Следовательно, токсичность декоративного физалиса нужно учитывать при выращивании этого растения, так как алкалоиды группы атропина оказывают сильное физиологическое действие на организм человека [6].

Таблица 1. Значения R_f компонентов экстрактов, определенные методом ТСХ с использованием атропина как свидетеля

Экстракты				Свидетель
физалис овощной (Колумбия)		физалис декоративный (Лен. область)		
(1) плоды	(2) чехлики	(3) плоды	(4) чехлики	Атропин
0	0	0	0	
—	—	0,06	0,06	
—	—	0,18	0,18	
0,37	0,37	0,32	0,32	
0,41	—	—	—	
0,46	—	—	—	
0,61	—	—	—	
0,70	0,70	0,70	0,70	0,72
0,87	0,86	0,86	0,87	
0,95	0,95	0,95	0,95	

Тропановые алкалоиды являются конкурентными антагонистами мускаринового ацетилхолинового рецептора (mAChR), препятствующими его связыванию с ацетилхолином. Рецептор mAChR включает 5 подтипов (M1-M5) [7]. При воздействии ТА на рецепторы M1, M3 и M5, связанные с белком Gq, происходит активация фосфолипазы C, что влияет на концентрацию кальция и функционирование кальций-кальмодулиновой системы в цитозоле клетки. Рецепторы M2 и M4, с другой стороны, соединяются с белком Gi и ингибируют аденилатциклазу, регулируя концентрацию циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Рецепторы M1 встречаются в клетках центральной нервной системы и ганглиях и влияют на когнитивные процессы. M3-рецепторы участвуют в регуляции сокращения гладких мышц. Рецепторы M4 были обнаружены в клетках коры больших полушарий мозга, гиппокампа и полосатого тела

мозга. Предполагается, что рецепторы M5 участвуют в механизмах микроциркуляции, вазоконстрикции и вазодилатации, активируя NO синтеза головного мозга.

Атропин и гиосциамин снижают тонус гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта, желчного и мочевого пузыря и бронхов. Применяются при язвенных болезнях, для стимуляции сердечной деятельности при лечении инфаркта миокарда. Уменьшают тонус мышц глаза, вызывают паралич аккомодации и используются при диагностике глазных болезней. Обладают слабым местноанестезирующим действием и влияют на центральную нервную систему. Применяются при лечении болезни Паркинсона и отравлении морфином и другими анальгетиками.

Скополамин сильнее влияет на центральную нервную систему. Применяется как седативное средство в психиатрии и наркологии.

Вывод. Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) с окрашиванием реактивом Драгендорфа по Мунье использован для скрининг-анализа алкалоидов тропанового ряда. Установлено наличие атропина (\pm гиосциамина) в экстракте чехликов физалиса декоративно-го, произрастающего в Ленинградской области.

Список литературы

1. Munoz P., Parra F., Simirgiotis M.J., Sepulveda Chavera G.F., Parra C. Chemical Characterization, Nutritional and Bioactive Properties of *Physalis peruviana* Fruit from High Areas of the Atacama Desert // *Foods*, 2021, 10, p. 2699-2711.

2. Витанолиды в экстрактах растений Ашваганда (*Withania Somnifera*), физалис (*Physalis Philadelphica*). Молекулярные аспекты биологического действия / Е. А. Соколова, Н. П. Степанова, Н. С. Раснюк // *Биохимия XXI века : Материалы научно-практической конференции с международным участием*, Краснодар, 26 ноября 2021 года. Краснодар: ООО «Качество», 2021. С. 213-219.

3. Popova V., Petkova Zh., Mazova N., Ivanova T., Petkova N., Stoyanova M., Stoyanova A., Ercisli S., Okcu Z., Skrovankova S., Mlcek J. Chemical Composition Assessment of Structural Parts (Seeds, Peel, Pulp) of *Physalis alkekengi* L. Fruits // *Molecules*. 2022, 27, p. 5787-5802.

4. de Nijs M., Crews C., Dorgelo F., MacDonald S., Mulder P.P.J. Emerging Issues on Tropane Alkaloid Contamination of Food in Europe. *Toxins*. 2023, 15 (2), 98.

5. <https://doi.org/10.3390/toxins15020098>

6. Binaglia M., Baert K., Schutte M. Serafimova R. EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Scientific Report on the overview of available toxicity data for calystegines // EFSA Journal. 2019. Vol. 17(1) : 5574. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5574>

7. Arcella D., Altieri A. Human acute exposure assessment to tropane alkaloids. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific report // EFSA Journal. 2018. Vol. 16(2) : 5160. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5160

8. Kohnen-Johannsen K.L., Kayser O. Tropane Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production. Molecules. 2019, 24, 796–818. DOI: 10.3390/molecules24040796

9. Темердашев А. З. Хроматографическое определение некоторых тропановых алкалоидов в дурмане индийском / А. З. Темердашев, И. А. Колычев, Н. В. Киселева // Журнал аналитической химии. 2012. Т. 67, № 12. С. 1084. EDN MCNHDN. Москва, 2004. 21 с. EDN NHPJIR. Дата посещения: 02.03.2023

10. Christen P., Bieri S., Berkov S. Methods of Analysis: Tropane Alkaloids from Plant Origin // Ramawat, K., Merillon, JM. (eds) Natural Products. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_35

УДК 54.06

*Дикарева Е.О., Иванова И.С., Попов А.С.
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург
Ivanovaira1@yandex.ru*

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШАМПУНЕЙ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ

*В работе проанализирован химический состав шампуней на биологической основе; показано, что производные натуральных масел являются поверхностно-активными веществами, которые могут служить заменой традиционным синтетическим моющим средствам. Воздействие водных растворов шампуня различной концентрации на биотест *Vicia faba* показало ускорение роста биомассы и ее качественное изменение (увеличение количества хлорофилла и аскорбиновой кислоты). Микроморфологический метод выявил нарушения на клеточном уровне развития корневой системы на 14-й день прорастания. С помощью биотеста на поведенческие реакции *Tubifex tubifex* был оценен токсический эффект. Сделан вывод, что массовая замена традиционных синтети-*

ческих моющих средств на природные и биоорганические практически не изменит воздействие на экологию.

Ключевые слова: ПАВ (поверхностно-активные вещества), шампуни, биотестирование.

Dikareva E.O., Ivanova I.S., Popov A.S.

*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg*

ASSESSMENT OF POSSIBLE ENVIRONMENTAL IMPACT AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF SHAMPOOS MADE ON THE BASIS OF NATURAL COMPONENTS

*The paper analyzes the chemical composition of biologically based shampoos; it is shown that derivatives of natural oils are surfactants that can serve as a substitute for traditional synthetic detergents. The effect of aqueous shampoo solutions of various concentrations on the biotest of *Vicia faba* showed an acceleration of biomass growth and its qualitative change (an increase in the amount of chlorophyll and ascorbic acid). The micromorphological method revealed violations at the cellular level of root system development on the 14th day of germination. With the help of a biotest on the behavioral reactions of *Tubifex tubifex*, the toxic effect was evaluated. It is concluded that the mass replacement of traditional synthetic detergents with natural and bio-organic ones will practically not change the impact on the environment.*

Keywords: *Surfactants, shampoos, biotesting.*

Одним из видов загрязнения водных и наземных экосистем является загрязнение поверхностно-активными веществами (ПАВ). С осознанием потенциальной опасности обычных поверхностно-активных веществ для окружающей среды и здоровья человека растет интерес к разработке поверхностно-активных веществ на биологической основе для средств личной гигиены. Эти вещества считаются более безопасными, их много, они поддаются биологическому разложению и биосовместимы. Исследуемые «био-шампуни» принадлежат линейке косметических средств, выпускаемой под брендом Natura Siberica. Серия шампуней «Natura Siberica Doctor Taiga», включает продукты, отличающиеся натуральными и органическими ингредиентами, такими как сибирский женьшень, аралия маньчжурская, роза шикотанская, лемонграсс нанайский, береза белая и черная, кора и масло кедра, облепиховое масло и др. Детальный анализ основных компонентов названных косметических средств показывает наличие поверхностно-активных веществ, которые спо-

способны создавать экологическую нагрузку. Несмотря на то, что ПАВ могут сравнительно быстро разрушаться в окружающей среде, только Lauryl Glucoside (III) как алкилполигликозид считается безопасным, поскольку продуктами гидролиза являются углеводы [3]. Вместе с тем, есть информация, что скорость разложения ПАВ, которые адсорбированы на различных межфазных поверхностях, снижается многократно по сравнению с мицеллярными растворами [1].

Целью нашего исследования стала оценка экологической нагрузки и биологической активности шампуней, изготовленных на основе природных компонентов (серии «Natura Siberica Doctor Taiga») на прорастание и рост растений черных бобов (*Vicia fába*) и поведенческие реакции трубочника обыкновенного (*Tubifex tubifex*).

Для этого были проведены следующие исследования: 1. Определена интегральная концентрация природных и синтетических ПАВ по величине поверхностного натяжения; 2. Проведен микроморфологический анализ корешков ростков бобовых (*Vicia fába*); 3. Измерена концентрация хлорофилла и аскорбиновой кислоты в проростках бобовых *Vicia fába*; 4. Проведена оценка возможной экологической нагрузки с использованием биоиндикатора *Tubifex tubifex*.

Определение коэффициента поверхностного натяжения растворов. Использовали стагалагмометрический метод. Коэффициент поверхностного натяжения растворов шампуня определяли по формуле:

$$b = Vpg / 2\pi rn,$$

где p — это плотность растворов шампуней, измеренная ареометром (г/мл), n — это количество капель раствора в 1 мл, V — объем (1 мл), g — ускорение свободного падения (9,8 м/с²), r — радиус капилляра, π — 3,14

Интегральное содержание ПАВ находили по измеренному коэффициенту поверхностного натяжения.

Микроморфологическое исследование корешков бобов. В качестве стандартного биологического теста был выбран метод проращивания бобов черных сорта «Кармазин» Российской национальной селекции. Это среднеранний урожайный сорт, период от всходов до технической спелости 75-90 дней, растения высокие, сильноветвистые. Плоды прямые, гладкие, в технической спелости зеленые, с 3-5 крупными семенами, до 12 см длиной. Семена карминово-розового цвета, после сушки становятся красно-бронзовыми. При созревании бобы не растрескиваются. Для каждой концентрации шампуня и для контрольного варианта проращивали 50 семян бобов в трех повторностях: в сосуд выкладывали 50 семян и смачивали рас-

творами шампуня в воде. В контрольном варианте использовалась природная вода (водопроводная вода, отстоянная в течение 3 дней). Семена проращивали в течение 14 дней на свету и фиксировали процент всхожести семян, рост зародышевых корешков и длину ростков, общий вес проростков.

Корешки бобов длиной 12-17 мм фиксировали в 95% этаноле, так как установлено, что при температуре 23-25°C первые митозы у проросших семян бобов наблюдаются при этой длине корешков. Окрашивали препараты ацетокармином, приготовленным по Ремедеру. После фиксации и окрашивания отрезали кончик корешка (2-3 см), помещали на предметное стекло и нагревали в капле ацетокармина до кипения, процедуру повторяли 2 раза. Затем на корешок клали на предметное стекло и раздавливали покровным. Препараты исследовали на световом поле микроскопа МБИ-1 в проходящем свете с объективом $\times 40$.

Определение содержания аскорбиновой кислоты. Для каждой повторности, брали три образца проростков, для этого на весах взвешивали ростки семян бобов суммарной массой 2 грамма и заливали 2% раствором соляной кислоты в химическом стакане до отметки 50 мл, давали настояться 5 минут. Далее ростки помещали в фарфоровую ступку и растирали пестиком до получения однородной массы. Затем содержимое ступки переносили в воронку с бумажным фильтром, ступку и пестик обмывали над фильтром кислотой из стакана, после этого весь объем кислоты пропускали через фильтр с образцом. Отбирали пипеткой 5 мл приготовленной вытяжки и помещали в коническую колбу на 50 минут. Затем титровали вытяжку раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Титрование повторяли трижды, рассчитывали среднее арифметическое. Затем рассчитывали содержание аскорбиновой кислоты в каждом образце по формуле:

$$C=63V_T,$$

где C — содержание аскорбиновой кислоты, мг/100 г, V_T — среднее значение объема раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, затраченного на титрование.

Колориметрическое определение содержания хлорофилла в листьях исследуемых растений. Брали в трех повторностях навеску 0,5 г листьев бобов, помещали в ступку и растирали с небольшим количеством 95% этанола. Полученный гомогенизат помещали в мерную колбу на 25 мл и этанолом доводили раствор в колбе до метки и перемешивали. Затем определяли содержание хлорофилла на колориметре и рассчитывали его содержание в мг на 1 г сырой массы листа, в

процентах сырой массы листа по формуле: $C=85E1/E2$, где C — концентрация хлорофилла в анализируемом растворе мг/л, $E1$ — толщина слоя контрольного раствора, $E2$ — толщина слоя анализируемого раствора. Для расчета M — содержания хлорофилла в мг на 1 г зеленых листьев использовали формулу: $M=25C/1000$.

Оценка возможной экологической нагрузки с использованием биоиндикатора *Tubifex tubifex*. В качестве биоиндикатора возможной экологической нагрузки использовали трубочник обыкновенный (*Tubifex tubifex*). Трубочник относится к малощетинковым червям (*Oligochaeta*), детритофаг. Он может выдерживать очень сильное загрязнение при минимальном количестве растворенного в воде кислорода. По поведенческим реакциям (скорости образования конгломерата, гибели особей) [2, 4] судят о негативном воздействии.

Результаты и обсуждения. Интегральная концентрация ПАВ (в пересчете на стеарат-анион) приводится в табл. 1 и на рис. 1. Как и предполагалось, имеется прямая пропорциональность между количеством шампуня и интегральной концентрацией ПАВ.

Таблица 1. Поверхностное натяжение растворов шампуня и рассчитанное интегральное содержание стеарат-аниона

Концентрация, г/л	Поверхностное натяжение, Дж/м ²	Плотность р-ра, кг/м ³	Объем р-ра, мл	Число капель в объеме, шт.	Содержание анион-активных ПАВ, мг/л
Контроль	73,94	0,995	1	21	-
10	39,93	0,998	1	39	3,0
5	40,94	0,997	1	38	2,5
2	55,51	0,996	1	28	2,0

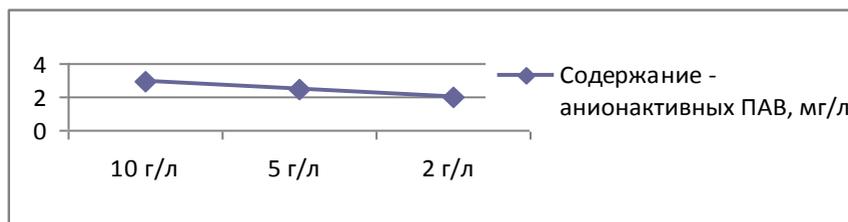


Рис. 1. Содержание анион-активных ПАВ, мг/л

Как следует из табл. 2, при всех концентрациях шампуня увеличивается процент всхожести семян бобов, также увеличивалась их масса, можно отметить незначительное увеличение средней длины корешков проростков.

Таблица 2. Влияние различных концентраций шампуня Doctor Taiga на рост и развитие растений бобов

Концентрация, г/л	% всхожести семян	Средняя длина корешков, мм	Средняя длина ростков, мм	Отношение длины корешков к длине ростков	Масса проростков, г
Контроль	63,8	2,3	1,5	1,5	0,063
10	83,3	2,5	1,0	2,5	0,088
5	83,3	2,7	1,3	2,2	0,096
2	88,8	2,5	1,5	1,6	0,120

Увеличение всхожести почти на 20%, возможно, происходит под воздействием ПАВ, увеличивается смачивание и набухание, т.е. происходит химическая скарификация семян. Эффективная работа листа и корня тесно связана с уровнем обменных процессов в растении, что находит свое отражение в содержании аскорбиновой кислоты и хлорофилла. Содержание хлорофилла с возрастом концентрации также увеличивалось в 1,1 раза, в 3,6 раза, в 4,5 раза соответственно [5]. Стоит обратить внимание, на то, что происходит как ускорение накопления количества биомассы, так и ее качественное изменение. Следовательно, обнаружена биологическая активность исследуемого косметического средства.

Чем больше концентрация шампуня, тем больший процент клеток корешков с повреждениями обнаруживается при микроморфологическом исследовании, обнаруживаются пузырьки на клеточной стенке и клетки с разрушенной клеточной стенкой.

Поведенческие реакции трубочника (*Tubifex tubifex*) представлены в табл. 3. В контрольной пробе скорость образования конгломерата трубочника составила примерно 1 минуту. Независимо от времени выдерживания червей в контрольной пробе, после размещения скорость образования конгломерата не менялась и оставалась равной приблизительно 1 минуте. При помещении червей

в различные концентрации шампуня их поведение менялось: с увеличением концентрации и увеличении времени выдержки трубочники становились менее активными, а далее погибали.

Таблица 3. Влияние различных концентраций шампуня на поведенческие реакции *Tubifex tubifex*

Концентрация, г/л	Влияние времени выдержки в пробе перед размешиванием (в секундах) на жизнь особей и время образования конгломерата (в секундах)				
	0	30	60	90	120
Контроль	60	60	60	60	60
10	50% особей смерть —	50% смерть —	50% смерть —	50% смерть —	смерть
7	20% особей смерть —	50% смерть —	50% смерть —	50% смерть —	смерть
5	60	60	100	20% смерть —	смерть
2	60	60	60	60	100

Примечание: прочерк в таблице — конгломерат не образуется.

Выводы. Косметические средства, изготовленные на основе природных компонентов обладают выраженной биологической активностью, вызывают ускорение прироста биомассы *Vicia faba* и ее качественное изменение — увеличивается удельное содержание хлорофилла и аскорбиновой кислоты.

ПАВ обладают биологической активностью. Это доказывается дегенеративными изменениями, прежде всего, корневой системы растений уже на 14-й день после прорастания. Обнаружено негативное воздействие шампуня на биоиндикатор *Tubifex tubifex* и его гибель. Массовое применение био-косметических средств вместо традиционных не исключит гибели первых компонентов пищевой цепочки и, следовательно, проблему возможного негативного воздействия на природные биоценозы решить такой заменой не удастся.

Список литературы

1. Паршикова Т. С. Участие поверхностно-активных веществ в регуляции развития микроскопических водорослей // Гидробиологический журнал. 2003. Т. 39, № 1. С. 64–70.
2. A bioassay of the toxic effects of aluminum chloride and aluminum sulfate using *Auloforus* (*Dero furcata*) / I. Ivanova, A. Popov, A. Chukhno, S. Kovalkova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Ussurijsk, 20–21 июня 2021 года. Ussurijsk, 2021. P. 022021. DOI 10.1088/1755-1315/937/2/022021.
3. Dierker M., Schäfer H.J. Surfactants from oleic, erucic and petroselinic acid: Synthesis and properties (англ.) // European Journal of Lipid Science and Technology. 2010. Vol. 112, no. 1. P. 122.
4. Ivanova I. S. Correlation of different bioindicators in the analysis of the toxic effects of various aluminum salts / I. S. Ivanova, A. S. Popov // Sviridov Readings — 2021: Тезисы докладов 9-й Международной конференции по химии и химическому образованию, Минск, 13–14 апреля 2021 года / Редколлегия: Т.Н. Воробьева (гл. ред.), Е.И. Василевская. Минск: Белорусский государственный университет, 2021. P. 82.
5. Popov A. Environmental impact and biological activity of bio-based shampoos / A. Popov, I. Ivanova // E3S Web of Conferences. 2023. № 420. С. 9–9. DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202342>.

УДК 577.357.464.23

*Зорина Т.Е.¹, Кравченко И.Е.¹, Коблов И.В.¹,
Баран Л.В.¹, Бисвоз С.³, Зорин В.П.^{1,2}*

¹Белорусский государственный университет

²МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ

Минск, Республика Беларусь

³Институт технологий и научных исследований Бирла

Пилани, Хайдерабад, Индия

zorinate@mail.ru

НАНОРАЗМЕРНЫЕ МИЦЕЛЛЫ ИЗ СОПОЛИМЕРОВ — ПОЛУЧЕНИЕ, СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

Исследованы структурные характеристики комплексов фотосенсибилизаторов хлорина e_6 и его диметилового эфира с мицеллами из блочных сополимеров. Показано, что скорость диссоциации молекул

хлоринов из комплексов зависит от их локализации в таких структурах и типа сополимера. Полученные результаты доказывают возможность использования блочных сополимеров для получения новых фармакологических форм фотосенсибилизаторов.

Ключевые слова: полимерные мицеллы, наноструктуры, фотосенсибилизаторы.

**Zorina T.E.¹, Kravchenko I.E.¹, Kablov I.V.¹, Baran L.V.¹,
Biswas S.³, Zorin V.P.^{1,2}**

¹Belarusian State University

²International Sakharov Environmental Institute, ISEI, BSU,
Minsk

³Birla Institute of Technology and Science
Pilani, Hyderabad, India

NANOSIZED MICELLES FROM COPOLYMERS — PREPARATION, STRUCTURAL CHARACTERISTICS, USE AS PLATFORMS FOR PHOTOSENSITIZERS

The structural characteristics of complexes of photosensitizers chlorin e_6 and its dimethyl ether with micelles of block copolymers were studied. It has been shown that the rate of dissociation of chlorin molecules from complexes depends on their localization in such structures and the type of copolymer. The results obtained prove the possibility of using block copolymers to obtain new pharmacological forms of photosensitizers.

Keywords: polymer micelles, nanostructures, photosensitizers.

Блочные сополимеры рассматриваются в качестве перспективной платформы при разработке новых типов наноносителей для введения в организм различных лекарственных соединений. Включение в состав подобных носителей позволяет модифицировать процессы биораспределения лекарственных препаратов и добиться пролонгации их действия. При использовании полимерных наноструктур лекарственный препарат защищен от инактивации при взаимодействии с белками и клетками крови. В сравнении с другими типами наноструктурных материалов наноносители на основе блочных сополимеров могут быть получены в больших количествах и с помощью относительно простых методов нагружены как неполярными, так и полярными лекарственными препаратами. Имеющиеся в литературе данные показывают, что результативность применения подобных наноносителей зависит как от их размеров и структуры, так и от физико-химических свойств молекул лекарственного препарата [1, 2].

В ряде работ показано, что амфифильные блочные сополимеры метокси-поли(этиленгликоль)-поли(D,L-лактид) (ППЛ) и метокси-поли(этиленгликоль)-b-поли(-капролактон) (ППК) способны в водной среде образовывать гидролитически стабильные наноструктуры (мицеллы). В структуре мицелл может быть выделена внешняя оболочка, формируемая гидрофильными цепями полиэтиленгликоля, и внутренняя область (ядро), которая содержит неполярные биологически деградируемые блоки полилактида и поликапролактона. Согласно данным литературы наноносители, получаемые с использованием данных типов сополимеров, показывают высокую результативность при использовании в качестве переносчиков лекарственных препаратов при химиотерапии онкологических и других заболеваний [1].

Ранее было показано, что ППЛ и ППК могут быть использованы для введения фотосенсибилизаторов (ФС) при разработке техники фотодинамической терапии (ФДТ). Введение ФС в составе мицелл позволяет увеличить эффективность доставки ФС к опухолевым клеткам и значительно усилить их чувствительность к действию видимого света [1, 2].

В данной работе рассматриваются методы получения нагруженных ФС мицелл на основе ППЛ и ППК, представлены результаты исследования их структурных и спектральных характеристик, проведена оценка стабильности структуры комплексов ФС с мицеллами. В качестве ФС в данном исследовании использовали известный ФС хлорин e_6 (Хл e_6) и его производное — диметилловый эфир хлорина e_6 (ДМЭ). С помощью специально разработанной методики проведено сравнение скоростей диссоциации молекул этих ФС из состава мицеллярных комплексов в присутствии белков сыворотки крови.

Материалы и методы. Фотосенсибилизаторы. В работе использовали Хл e_6 (содержание основного вещества более 95%) производства Frontier Scientific (США); ДМЭ (содержание основного вещества более 98 %) — производства РУП Белмедпрепараты (Беларусь). Исходные растворы Хл e_6 и ДМЭ готовили в этаноле в концентрации 1×10^{-3} М и хранили в темноте. Спектральные характеристики поглощения и флуоресценции данных соединений в различных модельных системах описаны ранее [3].

Получение мицелл полимеров ППЛ и ППК. Препараты полимеров ППЛ и ППК получены в Институте технологий и научных исследований Бирла (Индия). Процедура получения полимерные мицелл описана в [2]. Мицеллы ППЛ и ППК получали в результате регидро-

тации пленок, полученных при вакуумировании на роторном испарителе растворов полимеров и ФС или посредством диализа растворов полимеров в смеси диметилсульфоксида и воды. Суспензии мицелл концентрировали с использованием центрифужных фильтров (Centrifugal Filter Units, Amicon®, Ирландия).

При исследовании влияния степени нагрузки на структурные характеристики растворы ППЛ и ППК в концентрации 2,5 мг/мл ($3,5 \times 10^{-4}$ М ППЛ и $4,1 \times 10^{-4}$ М ППК) смешивали с растворами хлоринов в различной концентрации так, чтобы соотношение полимер:хлорин изменялось от 3:1 до 12:1. Агрегатное состояние хлоринов в мицеллах контролировали спектрофотометрически. При всех использованных степенях нагрузки Хл e_6 и ДМЭ в составе мицелл находились в мономерном состоянии.

Измерение степени включения Хл e_6 и ДМЭ в полимерные мицеллы. Эффективность включения хлоринов в мицеллы ППЛ и ППК оценивали по величине отношения оптических плотностей суспензий сразу после инкубирования в присутствии хлоринов и после очистки методом фильтрования. Оптическую плотность образцов измеряли при 660 нм после добавления детергента Тритон X-100 в концентрации 0,2%.

Приборы. Спектрально-флуоресцентные характеристики ФС в растворах и в составе мицелл исследовали на спектрофлуориметре SOLAR SFL-1211A (СОЛАР, Беларусь), спектры электронного поглощения — на спектрофотометре SOLAR PV 1251c (СОЛАР, Беларусь), оба прибора были оборудованы термостатируемыми ячейками и магнитными мешалками.

Размеры мицелл анализировали с использованием анализатора наночастиц Nanoparticle Size Analyzer «Brookhaven 90Plus» (Австрия) и атомно-силового микроскопа Solver P47PRO (НТ-МДТ, Россия). Техника определения характеристик наночастиц по данным динамического рассеяния света и атомно-силовой микроскопии (АМС) описана в работе [4].

Все эксперименты проводили в условиях термостатирования при 25 °С. В опытах использовали суспензии мицелл с концентрацией сополимера 0,1 мг/мл.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 в качестве примера показаны результаты исследования с помощью атомно-силового микроскопа полимерных частиц ППЛ, нагруженных Хл e_6 (ППЛ/Хл e_6 5:1). На основании анализа полученных изображений были построены объемные модели мицелл и определены их размеры.

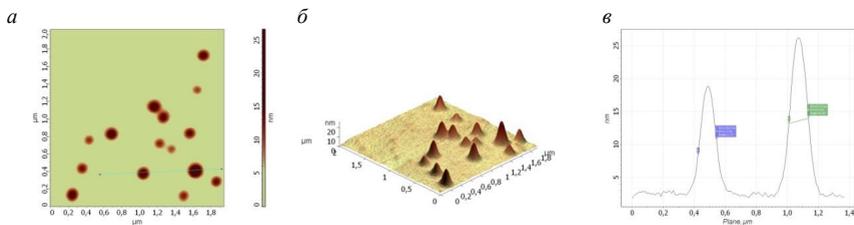


Рис. 1. АСМ-изображение и структурные характеристики мицелл ППЛ, нагруженных ФС: *а* — АСМ изображение мицелл ППЛ; *б* — объемная модель полимерных структур, построенная по АСМ-изображению; *в* — оценка размера и сечения рельефа поверхности ППЛ мицелл

Соотношение ППЛ:Хл e_6 (5:1).

Применение техники АСМ позволило сравнить размеры полимерных структур из ППЛ и ППК и определить степень влияния включения ФС на структуру мицелл. Согласно полученным данным средний диаметр мицелл, приготовленных из ППК равен 100-110 нм (табл. 1). Включение хлоринов практически не влияет на размеры мицеллярных частиц ППК. Следует отметить относительно высокий уровень полидисперсности частиц, что, вероятно, связано, с их агрегацией в водных растворах.

По данным АСМ средний диаметр ненагруженных мицелл из ППЛ равен 120 нм. Включение хлоринов сопровождается увеличением размеров мицелл ППЛ, при максимальной степени загрузки 30-35% средний диаметр полимерных везикул составляет 145-150 нм.

Результаты анализа размеров пустых и нагруженных хлоринами мицелл ППЛ и ППК, полученные методом динамического светорассеяния, согласуются с данными атомно-силовой микроскопии. Полученные методом светорассеяния средние размеры пустых мицелл ППЛ и ППК составляют 150 и 120 нм, соответственно. Включение в состав мицелл ППЛ и ППК исследуемых фотосенсибилизаторов приводит к небольшому 15-20% увеличению среднего диаметра наноструктур.

Эффективность включения хлоринов в мицеллы зависит от концентрации ФС, вводимых в раствор полимера. Для обоих типов полимеров данный показатель слабо зависел от состава мицелл и увеличивался с ростом концентрации ФС, но не превышал 35% (табл. 1).

Таблица 1. Характеристики наноразмерных полимерных мицелл ППЛ и ППК без нагрузки и в комплексах с Хл е₆ и ДМЭ

Объект исследования	Эффективность включения, %	Диаметр мицелл (нм)	Индекс полидисперсности	Дзета-потенциал (mV)
ППЛ	—	122,8±1,4	0,103±0,034	-23,5±3,7
ППЛ-Хл е ₆ 5:1	22±1,8	145,3±0,9	0,115±0,028	-25,2±4,6
ППЛ-ДМЭ 5:1	34±1,7	148,1±1,6	0,106±0,031	-26,2±3,8
ППК	—	110,6±1,5	0,117±0,036	-28,2±4,1
ППК- Хл е ₆ 5:1	28±1,8	114,3±1,3	0,124±0,026	-31,2±3,6
ППК-ДМЭ 5:1	35±1,7	118,1±1,1	0,128±0,024	-34,2±3,8

Структурные характеристики и степень агрегации мицелл определяются условиями их получения. Посредством изменения температуры, скоростей диализа и фильтрации, интенсивности встряхивания суспензии на стадии самоорганизации полимеров можно варьировать размеры получаемых мицелл из сополимеров в широких пределах (от 50 до 150 нм).

Исследования спектрально-флуоресцентных характеристик позволяют оценить агрегатное состояние и характер локализации хлоринов в мицеллярных комплексах. Относительно высокие значения интенсивности флуоресценции Хл е₆ и ДМЭ свидетельствуют, что независимо от степени нагрузки данные ФС в составе мицелл находятся преимущественно в мономерной форме.

Известно, что спектральные характеристики Хл е₆ и его производных зависят от полярности среды, в которой они находятся [3]. Анализ спектральных характеристик флуоресценции хлоринов в составе мицелл позволяет с высокой степенью вероятности предположить, что молекулы ДМЭ локализуются в центральной области мицелл ППЛ и ППК. Именно такая локализация обеспечивает неполярное микроокружение молекул ДМЭ, для которого характерно длинноволновое положение спектров возбуждения и флуоресценции.

Согласно данным спектрального анализа молекулы Хл e_6 в препаратах ППК располагаются аналогично ДМЭ — в неполярном ядре мицелл. Об этом свидетельствует совпадение положения максимума спектров возбуждения и испускания флуоресценции Хл e_6 в суспензии мицелл ППК и в растворах этанола или метанола. В то же время по данным спектральных измерений полярность микроокружения молекул Хл e_6 в ППЛ соответствует полярности водных растворов, что предполагает расположение центров связывания для этого сенсбилизатора в поверхностных слоях полимерных мицелл.

Заключения, касающиеся особенностей локализации хлоринов в составе исследуемых структур, сделанные на основе спектральных измерений, подтверждаются результатами измерений поляризационных характеристик флуоресценции. Флуоресценция Хл e_6 и ДМЭ в составе ППК характеризуется относительно высокими значениями степени поляризации флуоресценции (16-18%), что, очевидно, связано с жесткой фиксацией молекул хлоринов в составе ядра мицелл этого типа. Локализация молекул Хл e_6 в поверхностных структурах мицелл ППЛ, вероятно, обеспечивает их относительно высокую релаксационную подвижность, что находит отражение в более низких (10-12%) значениях степени поляризации флуоресценции.

При использовании полимерных мицелл в качестве наноносителей для целей ФДТ значительный интерес представляет оценка скорости выхода молекул ФС из состава комплексов. С целью сравнения данной характеристики для Хл e_6 и ДМЭ нагруженные хлоринами мицеллы помещали в раствор сывороточного альбумина или в 2% раствор сыворотки крови человека. За процессами диссоциации молекул ФС из комплексов и связывания с основными транспортными белками следили по данным измерений спектральных и поляризационных характеристик флуоресценции.

Согласно данным спектрального анализа практически все молекулы Хл e_6 выходят из мицелл ППЛ в течение 30-40 минут и связываются с сывороточным альбумином. В случае мицелл ППК скорость выхода данного ФС крайне низка — даже после 24 часов инкубирования большая часть молекул фотосенсбилизатора остаются в составе полимерных везикул.

При анализе процессов выхода из состава мицелл ДМЭ в качестве акцепторных структур мы использовали сыворотку крови, поскольку основными переносчиками молекул ДМЭ в плазме крови являются липопротеины низкой и высокой плотности [3].

Добавление сыворотки крови к суспензии мицелл обеспечивает возможность перераспределения ФС на липопротеины. Исследование кинетики изменений спектральных характеристик флуоресценции ДМЭ в составе полимерных мицелл (ППЛ и ППК) при добавлении сыворотки крови свидетельствует об очень медленном перераспределении его на белки сыворотки крови: спектры флуоресценции ДМЭ в составе мицелл ППЛ и ППК при инкубировании в присутствии сыворотки крови практически не изменялись на протяжении 24 часов (данные не приведены).

Структурная устойчивость и неизменность физико-химических характеристик полимерных мицелл и их комплексов с ФС имеют принципиальное значение при использовании в ФДТ. Синтезированные мицеллы ППЛ и ППК в свободном виде, а также мицеллы, нагруженные хлоринами, сохраняют неизменными свои основные структурные характеристики на протяжении по крайней мере 2 недель хранения в водных растворах. Согласно нашим данным средние размеры мицелл и степень их полидисперсности при хранении в течение 10–15 дней изменяются не более чем на 10–15%.

Заключение. Полученные результаты показывают, что блочные сополимеры ППЛ и ППК могут быть использованы для создания новых фармакологических форм ФС. Изменение структурных характеристик подобных форм позволит направленно контролировать фармакокинетику фотосенсибилизаторов при проведении фотодинамической терапии.

Список литературы

1. Mamnoon B. et al. Targeted polymeric nanoparticles for drug delivery to hypoxic, triple-negative breast tumors // *ACS Appl. Bio Mater.* 2021. V. 4. P. 1450–1460.
2. Kumari P. et al. Polylactide-Based Block Copolymeric Micelles Loaded with Chlorin e_6 for Photodynamic Therapy: In Vitro Evaluation in Monolayer and 3D Spheroid Models // *Molecular Pharmaceutics.* 2017. № 11. V. 14. P. 3789–3800.
3. Хлудеев И.И., Козырь Л.А., Зорина Т.Е., Зорин В.П. pH-зависимые изменения механизмов транспорта хлорина e_6 и его производных в крови // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015. Т. 160, № 8, С. 170–175.
4. Yakavets I. et al. Temoporfin-in-cyclodextrin-in-liposome — a new approach for anticancer drug delivery: the optimization of composition // *Nanomaterials.* 2018. Vol. 8 (10). P. 847–861.

*Колесникова Т.С., Уфлянд И.Е.
Южный федеральный университет,
Ростов-на-Дону
tkol@sfedu.ru*

НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИРИДОКСИНА ГИДРОХЛОРИДА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

Разработан чувствительный и селективный метод определения пиридоксина гидрохлорида, основанный на окислении хлорид-иона, входящего в состав его молекулы, извлечении образовавшегося хлора потоком воздуха и его взаимодействии с твердофазным аналитическим реагентом, модифицированным нанокompозитом серебра. Метод не требует предварительной пробоподготовки.

Ключевые слова: пиридоксина гидрохлорид, нанокompозиты серебра, твердофазный аналитический реагент, газовая экстракция.

*Kolesnikova T.S., Uflyand I.E.
Southern Federal University,
Rostov-on-Don*

THE NEW METHOD FOR DETERMINATION OF PYRIDOXINE HYDROCHLORIDE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

A sensitive and selective method for the determination of pyridoxine hydrochloride has been developed, based on the oxidation of the chloride ion included in its molecule, the extraction of the resulting chlorine with an air stream and its interaction with a solid-phase analytical reagent modified with a silver nanocomposite. The method does not require preliminary sample preparation.

Keywords: pyridoxine hydrochloride, silver nanocomposites, solid-phase analytical reagent, gas extraction.

Пиридоксина гидрохлорид, также известный как витамин В₆, является важным питательным веществом, необходимым для нормального функционирования организма. Он относится к группе витаминов В-комплекса, которые играют ключевую роль в обмене веществ и поддержании здоровья нервной системы. Витамин В₆ участвует во многих биохимических реакциях организма, включая синтез гемоглобина, метаболизм аминокислот и образование некоторых нейромедиаторов. Кроме этого, он помогает поддерживать здоровье кожи, волос и ногтей.

Пиридоксина гидрохлорид широко используется в медицине с целью восполнения дефицита витамина В₆. Он доступен в различ-

ных формах: как самостоятельное вещество (таблетки, капсулы, порошки), так и как компонент различных минерально-витаминных комплексов.

Для определения содержания пиридоксина гидрохлорида могут быть использованы хроматографические и спектрофотометрические методы, которые требуют предварительной пробоподготовки и не позволяют проводить определение в окрашенных растворах. Нами разработан простой и доступный метод определения пиридоксина гидрохлорида, основанный на окислении хлорид-иона, входящего в состав его молекулы, извлечении образовавшегося хлора потоком воздуха и его взаимодействии с серебром, входящим в состав твердофазного аналитического реагента (ТАР).

ТАР изготавливается в лаборатории и представляет собой фильтровальную бумагу марки Whatman 595 (плотность $62,5 \text{ г/м}^2$, толщина $0,17 \text{ мм}$, диаметр пор $7\text{--}11 \text{ мкм}$), пропитанную раствором нанокмпозита серебра и разрезанную на небольшие полоски для удобства ее использования в анализе. Следует отметить, что в последние годы ТАРы все более широко применяются в контроле качества питьевой и природных вод, пищевых продуктов и фармацевтических препаратов [1–5]. Их действие основано на изменении окраски в результате химической реакции компонента ТАР (красителя, наночастиц и т.д.) с определяемым веществом или его производным [6–9]. Однако при непосредственном контакте ТАР с анализируемым раствором возможно смывание реагента с поверхности ТАР, и в этом случае процессы сорбции, которые позволяют решать вопросы разделения и концентрирования в различных технологических и аналитических задачах, носят негативный характер [6, 10]. Исходя из этого, для реализации разработанного метода нами использовалась специальная реакционная система, представляющая из себя установку для динамической газовой экстракции. Ее основные компоненты представлены на рис. 1. Раствор, содержащий хлориды, помещался в стеклянный сосуд, к нему добавлялись перманганат калия ($0,2 \text{ М}$) и концентрированная серная кислота. Затем в течение 20 минут проводилась газовая экстракция образовавшегося хлора потоком воздуха, подаваемого микрокомпрессором.

Достигая поверхности ТАР, находящегося в индикаторном устройстве, хлор взаимодействовал с серебром. При этом в реакционной зоне ТАР наблюдалось изменение окраски (серебристо-серая — светло-бежевая).

Через 20 минут бумажные полоски извлекались из устройства и сканировались на белом фоне. Затем изображения обрабатывались

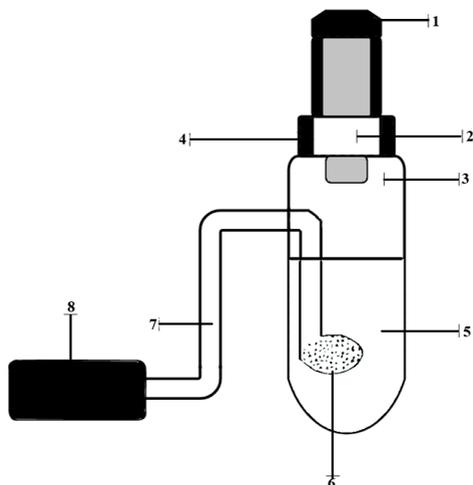


Рис. 1. Установка для динамической газовой экстракции: 1 — резиновая пробка; 2 — тест-полоска; 3 — стеклянный сосуд для анализируемого раствора; 4 — держатель тест-полосок; 5 — реакционная смесь; 6 — стеклянный барботер; 7 — полимерный шланг; 8 — воздушный микрокомпрессор

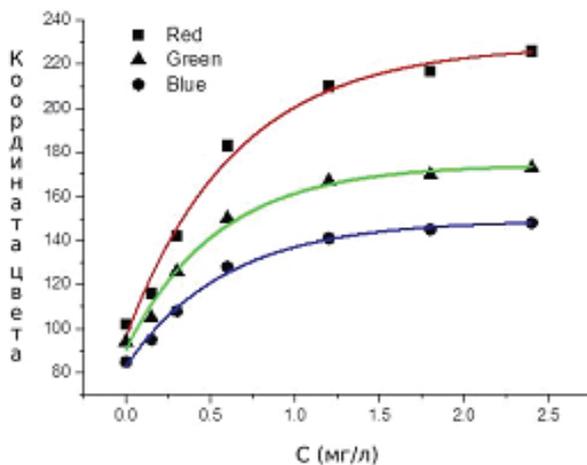


Рис. 2. Графики зависимости координат цвета R, G и B от концентрации хлоридов

путем усреднения значений соответствующих цветовых координат системы RGB внутри реакционной зоны ТАР.

Установлено, что в выбранном диапазоне зависимость R, G и B координат от концентрации хлорид-ионов адекватно описывается экспоненциальным уравнением первого порядка $y=y_0 + A(1 - e^{-c/t})$:

Известно, что критерием выбора координаты цвета, наиболее подходящей для аналитического применения, является максимум отношения A/t . Путем сравнения параметров экспоненциальных уравнений, описывающих графические зависимости (рис. 2), можно заключить, что самой чувствительной к концентрации хлоридов является красная координата. В данном случае это отношение составляет 203, 156 и 111 для R, G и B координат соответственно, что явно указывает на перспективность использования R-координаты для определения хлорид-ионов по рекомендуемой методике. Таким образом, был установлен диапазон определяемых концентраций хлорид-ионов, он составляет от 0.15 до 0.24 мг/л.

Апробация предлагаемой методики проводилась на фармацевтических препаратах различных производителей. Были выбраны объекты с широким диапазоном содержания пиридоксина гидрохлорида. С целью подтверждения селективности разработанной методики анализировались объекты с отсутствием (препарат 1) и присутствием различных сопутствующих веществ (препараты 2 и 3). Стоит отметить, что препарат 3 содержал краситель, что исключало возможность использования спектрофотометрии в качестве контрольного метода. Представленные в таблице 1 результаты демонстрируют возможности методики, показывают сходимость с контрольным методом и отсутствие мешающего влияния сопутствующих веществ.

На основании вышеизложенного можно заключить, что разработанная методика является хорошей альтернативой методам контроля качества фармацевтических препаратов, содержащих хлорид-ион. Следует отметить, что основным достоинством разработанной методики является высокая чувствительность (0,4 мкмоль в пробе) и селективность. Это открывает широкие возможности применения методики для определения микроколичеств пиридоксина гидрохлорида в тканях и биологических жидкостях, что позволит в перспективе решать важные вопросы токсикологии и фармакокинетики.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 22-13-00260.

Таблица 1. Результаты определения пиридоксина гидрохлорида в фармацевтических препаратах (n=5; p=0,95; F_{теор}=6,59; t=2,78)

Препарат/ Вещество/ Производитель	Сопутствующие вещества	Определено				Fэксп	Мера правильности, %
		разработанным методом		контрольным методом			
		$\bar{X} \pm \delta$	Sr., %	$\bar{X} \pm \delta$	Sr., %		
«Пиридоксина гидрохлорид», раствор для инъекций/ пиридоксина гидрохлорид — 50 мг/мл / Борисовский ЗМП, Беларусь	—	50±2	3,2	51±3*	4,7	2,25	98,0
«Пиридоксина гидрохлорид», таблетки/ пиридоксина гидрохлорид — 10 мг/ Озон, Россия	Глюкоза — 77,5 мг, целлюлоза микрокристаллическая — 10 мг, кремния диоксид коллоидный — 0,5 мг, кальция стеарат — 1 мг, тальк — 1 мг	9,6±0,8	6,8	10,1±1,1**	8,7	2,27	95,1
Магний В ₆ таблетки шипучие»/ пиридоксина гидрохлорид — 1,4 мг /Pez	Лимонная кислота, гидрокарбонат натрия; сахар, гидрокарбонат магния ароматизатор, аспартам, желтый краситель: нат-	1,45±0,11	6,1	1,39±0,12***	6,9	1,21	104,3

Препарат/ Вещество/ Производитель	Сопутствующие вещества	Определено				Фэксп	Мера правильности, %
		разработанным методом		контрольным методом			
		$\bar{X} \pm \delta$	Sr., %	$\bar{X} \pm \delta$	Sr., %		
Production Europe Kft, Венгрия	риевая соль рибофлавин 5-фосфат						

Контрольные методы: * спектрофотометрия по ФС 42-3213-95 без фильтрования; ** спектрофотометрия по ФС 42-3213-95 с предварительным фильтрованием; *** потенциометрическое титрование.

Список литературы

1. Gorbunova M.O., Bayan E.M. A novel paper-based sensor for determination of halogens and halides by dynamic gas extraction // *Talanta*. 2019. Т. 199. С. 513-521.
2. Горбунова М.О., Баян Е.М., Войциховская Е.В. Глюкотест для контроля качества продовольственного сырья и пищевых продуктов // *Журнал аналитической химии*. 2010. Т. 65. № 11. С. 1224-1228.
3. Горбунова М.О., Жихарева И.Н. Тест-метод определения активного хлора в питьевой воде // *Журнал аналитической химии*. 2003. Т. 58. № 7. С. 741.
4. Князева Т.В., Горбунова М.О., Черная Г.О. Определение меди в напитках // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2000. № 2-3 (255-256). С. 90-92.
5. Горбунова М.О., Баян Е.М., Могучих Е.А. Экспресс-диагностика экологического состояния водоемов // В сборнике: Вопросы сохранения биоразнообразия водных объектов: материалы Международной научной конференции. Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства (ФГБНУ «АзНИИРХ»). 2015. С. 80-84.
6. Апяри В.В., Фурлетов А.А., Гаршев А.В., Волков П.А., Горбунова М.О., Шевченко А.В. Получение реактивных индикаторных бумаг с треугольными нанопластинками серебра для химического анализа // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2017. Т. 58. № 4. С. 170-177.
7. Горбунова М.О., Кононова А.Ю., Втулкина В.Э. Экстракционное визуально-тестовое и цветометрическое определение хлора в воде с использованием реактивной индикаторной бумаги, импрегнированной метиловым оранжевым // *Вода: химия и экология*. 2014. №12 (78). С. 76-80.

8. Gorbunova M.O., Baulina A.A., Kulyaginova M.S., Apyari V.V., Furlotov A.A., Garshev A.V., Dmitrienko S.G. Determination of iodide based on dynamic gas extraction and colorimetric detection by paper modified with silver triangular nanoplates // *Microchemical Journal*. 2019. Т. 145. С. 729-736.

9. Горбунова М.О., Баян Е.М. Тест-метод определения сероводорода и сульфидов в водах с предварительной газовой экстракцией // *Журнал аналитической химии*. 2017. Т. 72. №12. С. 1126-1133.

10. Баян Е.М., Лупейко Т.Г., Горбунова М.О., Толстоброва Е.В. Очистка сточных вод от ионов алюминия техногенным карбонатсодержащим реагентом // *Экология и промышленность России*. 2018. Т. 22. № 1. С. 50-55.

УДК 614.484

Ланцова Е.А.

*Тульский государственный университет,
Тула*

e.a.lantsova@tsu.tula.ru

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРОУПРАВЛЯЮЩЕГО АГЕНТА НА ВРЕМЯ ОБРАЗОВАНИЯ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО ГИБРИДНОГО АНТИСЕПТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В работе сформированы антисептические гибридные кремнийорганические материалы с использованием структурообразующих агентов (хитозан, поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль). Определено время образования гибридного материала и его структура методом оптической микроскопии.

Ключевые слова: *золь-гель, антисептический материал, метилтриэтоксисилан, тетраэтоксисилан, структуроуправляющий агент.*

Lantsova E.A.

*Tula State University
Tula, Russia*

INFLUENCE OF STRUCTURE-CONTROLLING AGENT ON THE FORMATION TIME OF ORGANOSILICON HYBRID ANTISEPTIC MATERIAL

In this work, antiseptic hybrid organosilicon materials were formed using structure-forming agents (chitosan, polyvinyl alcohol, polyethylene glycol). The formation time of the hybrid material and its structure were determined by optical microscopy.

Keywords: *sol-gel, antiseptic material, methyltriethoxysilane, tetraethoxysilane, structure control agent.*

Одной из главных глобальных проблем является формирование бактериальных биопленок. Клетки в структуре биопленок проявляют большую резистентность к воздействию антибактериальных средств. Микробные биопленки оказывают большое влияние на сферы жизни человека, становятся причинами заболеваний и приводят к большим экономическим потерям. Согласно данным анализа оценки влияния биопленок на глобальную экономику, выполненному по заказу National Biofilms Innovation Centre, до пандемии COVID-19 размер потерь превышает 5000 млрд долларов в год [1]. Более 80% микробных инфекций в организме человека связаны с образованием биопленок, существует проблема образования биопленок на катетерах, имплантах и протезах.

Для борьбы с биопленками и планктонными культурами существуют различные методы. Традиционным способом предотвращения обрастания поверхностей является применение жидких форм антисептиков. Существует большое количество разнообразных по составу дезинфицирующих средств, среди которых выделяются средства на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС). При взаимодействии положительно заряженного четвертичного атома азота и отрицательно заряженной бактериальной клеточной мембраны происходит электростатическое взаимодействие, которое приводит к лизису клетки [2]. Однако, часто требуется увеличенный расход антисептиков для дезинфицирующего действия из-за их неэффективности. Это приводит к попаданию средства в окружающую среду и увеличению резистентности бактерий. Решением описанных проблем может быть иммобилизация эффективных классов ЧАС (например, октенидина дигидрохлорида) на поверхности наночастиц, полимерной основы или мембраны [3].

Материал-носитель антисептического средства можно создать методом золь-гель синтеза, поскольку использование силановых прекурсоров позволяет создать пористые материалы с большой удельной поверхностью [4]. Обладая настраиваемой структурой, мезопористые кремнийсодержащие материалы способны загружать различные молекулы. Эффективный антисептик (октенидин) будет постепенно высвобождаться в небольших концентрациях, что позволит уменьшить вред окружающей среде, что также замедлит рост резистентности микроорганизмов.

Для формирования материалов с порами одинакового размера часто используют метод шаблонов (темплатов) [5]. Одним из перспективных направлений является использование в качестве тем-

платов клеток микроорганизмов, поскольку они характеризуются богатым разнообразием форм, низкой стоимостью и экологичностью и высокой повторяемостью морфологии [6]. Кроме природы веществ-темплатов на морфологию гибридного материала может оказывать влияние структуроуправляющее вещество. В процессах золь-гель синтеза подобные соединения выступают в качестве затравки для начала гелеобразования и придают гибкость конечной структуре кремнийорганического материала.

Был сформирован ряд кремнийорганических матриц с одинаковым соотношением силановых прекурсоров метилтриэтоксисилана (МТЭС) и тетраэтоксисилана (ТЭОС) 85 об. % к 15 об. %. Данное соотношение было выбрано, поскольку ранее нашим научным коллективом был доказан факт полной инкапсуляции клеток дрожжей в золь-гель матрицу МТЭС/ТЭОС 85/15 [7,8]. В качестве структуроуправляющих агентов в данном исследовании использованы хитозан, поливиниловый спирт (ПВС) и полиэтиленгликоль (ПЭГ). В качестве порообразующих темплатов были использованы клетки дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559. Ранее показана их эффективность в качестве порообразующего агента, которая отразилась в возможности сорбировать большее количество октенидина дигидрохлорида [9].

С помощью метода оптической микроскопии определено время образования золь-гель материала с инкапсулированными клетками *Og. polymorpha* при использовании различных структуроуправляющих агентов.

В начальное время (0 ч) на рис. 1 видны свободные клетки дрожжей, через 2 часа вокруг клеток образовалась кремнийорганическая матрица с использованием хитозана. Через 3 часа клетки полностью инкапсулировались в матрицу с добавлением ПВС, матрица с использованием ПЭГ образовалась только через 5 часов после завершения реакций синтеза. Образовавшиеся структуры представляют собой клетки дрожжей, покрытые шероховатым сплошным материалом. Таким образом, природа структуроуправляющих агентов влияет на время формирования, и, вероятно, на внутреннюю структуру гибридного материала-носителя антисептика. В дальнейшем, предположение будет проверено методами низкотемпературной адсорбции азота и сканирующей электронной микроскопии, а также будет определена загрузочная способность каждой матрицы для выявления наиболее эффективной.

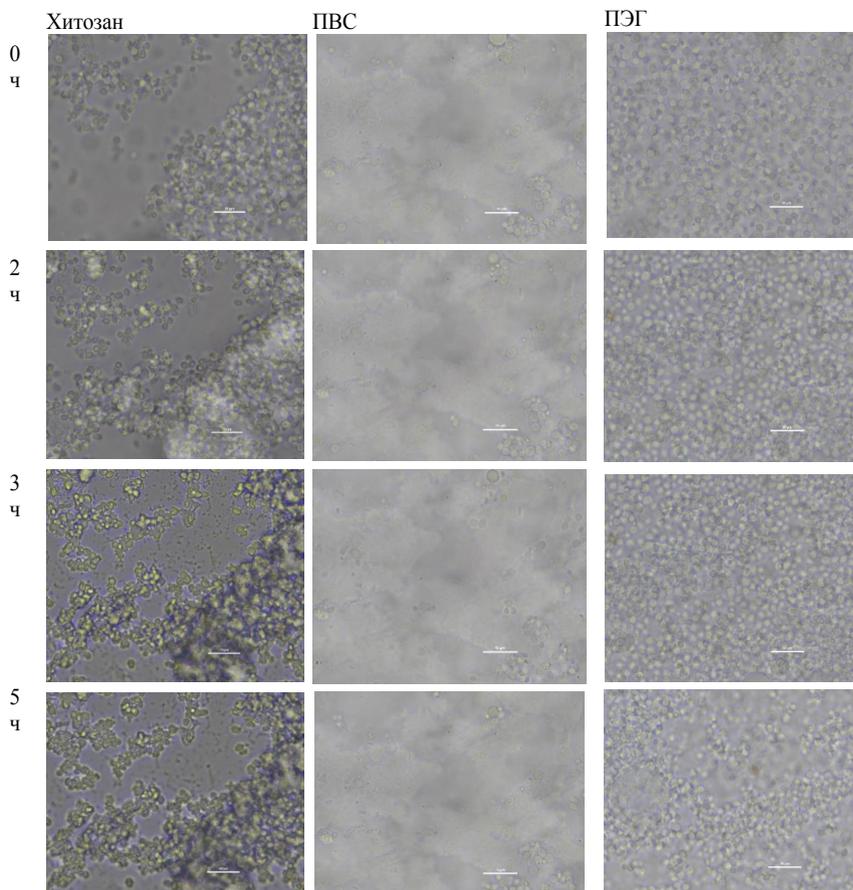


Рис. 1. Оптическая микроскопия процесса образования кремнийорганического гибридного материала с использованием хитозана, ПВС и ПЭГ в течение 5 часов после проведения реакций золь-гель синтеза.
Бар-метка — 10 мкм

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ, РНФ № 22-23-20129, <https://rscf.ru/project/22-23-20129> и поддержки правительства Тульской области.

Список литературы

1. Highmore C.J. et al. Translational challenges and opportunities in biofilm science: a BRIEF for the future // *npj Biofilms Microbiomes*. 2022. Vol. 8, № 1. P. 68.
2. Saverina E.A. et al. From Antibacterial to Antibiofilm Targeting: An Emerging Paradigm Shift in the Development of Quaternary Ammonium Compounds (QACs) // *ACS Infect. Dis.* ACS Publications, 2023. Vol. 9, № 3. P. 394–422.
3. Dubovoy V. et al. One-Pot Hydrothermal Synthesis of Benzalkonium-Templated Mesoporous Silica Antibacterial Agents // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2018. Vol. 140, № 42. P. 13534–13537.
4. Hosseini L., Moreno-Atanasio R., Neville F. Synthesis of Hollow Silica Nanoparticle Aggregates from Asymmetric Methyltrimethoxysilane Using a Modified SBA-15 Method // *Langmuir*. American Chemical Society, 2019. Vol. 35, № 24. P. 7896–7904.
5. Carvalho G.C. et al. Cetyltrimethylammonium bromide in the synthesis of mesoporous silica nanoparticles: General aspects and in vitro toxicity // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2022. P. 102746.
6. Chang Y.-C., Lee C.-Y., Chiu H.-T. Porous inorganic materials from living porogens: channel-like TiO₂ from yeast-assisted sol–gel process // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. ACS Publications, 2014. Vol. 6, № 1. P. 31–35.
7. Kamanina O.A. et al. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater // *Enzyme Microb. Technol.* 2016. Vol. 92.
8. Ланцова Е.А. Изучение структуры биогибридного золь-гель материала методом сканирующей электронной микроскопии // Сборник тезисов докладов Всероссийской конференции «XXIV Всероссийское совещание по неорганическим и органосиликатным покрытиям.» 2023. P. 65–66.
9. Ланцова Е.А. Формирование экологичного антибактериального кремнийорганического материала на основе октенидина дигидрохлорида // Сборник научных трудов по материалам VIII Международной научно-практической молодежной конференции «Горизонты биофармацевтики.» 2023. P. 105–107.

УДК 543.544.943.3.068.7

Лебедева Е.Я., Косман В.М., Карлина М.В., Дадали Ю.В.

АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

Ленинградская область

lebedeva.ey@doclinika.ru; kosman.vm@doclinika.ru;

karlina.mv@doclinika.ru; dadali.yv@doclinika.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЭТСХ В БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ: ЗА И ПРОТИВ

Высокоэффективную тонкослойную хроматографию (ВЭТСХ) широко применяют в различных аналитических исследованиях. Представлены материалы по разработке и валидации биоаналитической методики количественного определения гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в гомогенатах мозга крыс. Выделены достоинства и недостатки метода ВЭТСХ, показано, что с учетом современных валидационных требований его применение в биоаналитических исследованиях проблематично.

Ключевые слова: ВЭТСХ, валидация, биоаналитические исследования, ГАМК.

Lebedeva E.Y., Kosman V.M., Karlina M.V., Dadali Y.V.

RMC «HOME OF PHARMACY»,

Leningrad region

HPTLC APPLICATION IN BIOANALYTICAL RESEARCH: PROS AND CONS

High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) is widely used in various analytical and bioanalytical studies. The article presents materials on the development and validation of a bioanalytical study for the quantitative determination of gamma-aminobutyric acid (GABA) in rat brain homogenates. The advantages and disadvantages of the HPTLC method are highlighted, it is shown that, taking into account modern validation requirements, its application in bioanalytical research is problematic.

Keywords: HPTLC, validation, bioanalytical research, GABA.

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является важным нейромедиатором в центральной нервной системе человека. ГАМК синтезируется из глутамата при помощи фермента глутаматдекарбоксилазы (GAD). Гамма-аминомасляная кислота вырабатывается в нейронах и используется в синаптических контактах для переда-

чи нервных импульсов. ГАМК является одним из ключевых нейромедиаторов в центральной нервной системе и играет важную роль в регуляции множества физиологических процессов: поддержание мышечного тонуса, стабилизация эмоционального фона, развитие когнитивных функций, регуляция сна и бодрствования [1].

Совершенствование методик определения ГАМК позволит измерять концентрацию нейромедиатора в различных биологических образцах, в том числе в клинической практике для диагностики патологических состояний и мониторинга эффективности лечения, а также поможет в разработке более эффективных и безопасных лекарственных средств для лечения различных заболеваний, связанных с дисрегуляцией системы ГАМК.

Тонкослойная хроматография (ТСХ, в том числе высокоэффективная ТСХ — ВЭТСХ) является распространенным методом анализа и его используют для разделения и определения различных соединений, включая малые органические молекулы, такие как нейромедиаторы. Он отличается относительной простотой использования, доступностью и может быть эффективным для многих лабораторных исследований и клинических приложений.

Целью работы являлась разработка и валидация методики количественного определения ГАМК в биоматериале (головном мозге) лабораторных животных методом ТСХ на анализаторе CAMAG (CAMAG, Швейцария).

В работе использовали образец ГАМК (кат № 56-12-12, Sigma, USA Lot#BCCD 3000), использован в качестве стандартного образца (СО) ГАМК, коммерчески доступные растворители и реагенты: метанол, этанол, 1-бутанол, ледяная уксусная кислота, ацетон, нингидрин, пиридин (АО Вектон, АО Экос-1, Россия), пластины стеклянные для ТСХ «TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 1020 см» (Merck KGaA, Germany) и оборудование для тонкослойной хроматографии: блок для нанесения проб Camag Linomat 5 и измерительный блок TLC SCANNER 3 (CAMAG, Швейцария). Интактный биоматериал получен от лабораторных животных (крыс) питомника АО НПО ДОМ ФАРМАЦИИ, перед анализом его гомогенизировали при помощи измельчителя тканей Polytron PT-MR 1600E (Kinematica AG, Швейцария).

Обработка экспериментальных данных выполнена с помощью лицензированного программного обеспечения (Microsoft office, Excel) согласно рекомендациям по валидации биоаналитических методик [2, 3] с применением описательной статистики.

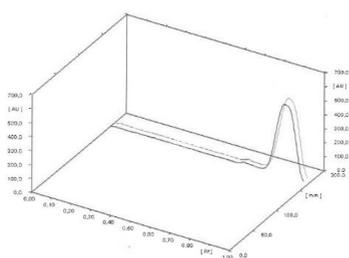
Согласно литературным данным метод ВЭТСХ применим для количественного определения ГАМК в различных объектах, в том числе, в биологических пробах [4-8]. Основные условия ВЭТСХ-анализа обобщены в таблице 1.

Таблица 1. Условия анализа ГАМК методом ВЭТСХ

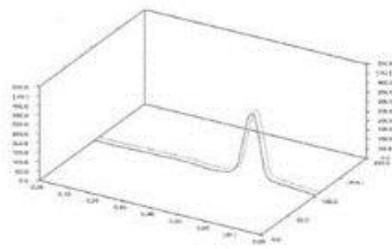
Приготовление раствора СО ГАМК	Приготовление гомогената головного мозга	Мобильная фаза, условия	Сушка	Дериватизация	Длина волны детектирования, нм	Литературный источник
Метанол	метанол	б:у: в 1 5:3:2 + 0,4% нингидрина, насыщение камеры 12 часов	2–3 мин после раз- деления при 60–65 °С, 5 мин после деривати- зации при 65–75 °С	0,4 % рас- твор нин- гидрин в мобиль- ной фазе	480	[8]
0,1 Н рас- твор со- ляной кис- лоты в этанол- ле	0,1 Н со- ляная кислота в этанол- ле	б:у: в 5:3:2, насы- щение 6 часов	20 мин после разделе- ния при 60–65 °С, 5 мин после деривати- зации при 65–75 °С	опры- скивание 0,2% рас- твором нинги- дрин в ацетоне	570	[9]
Этанол	0,1 М раствор со- ляной кисло- ты	б:у: в 65:18:28, насы- щение 3 часа	сушка на воздухе до исчезнова- ния запаха растворите- лей (40–60 мин), после деривати- зации 15 минут при 65–75 °С	опры- скивание 0,2% рас- твором нинги- дрин в ацетоне, содер- жащем пиридин	550	[10]

Примечание: ¹состав мобильной фазы для ТСХ — бутанол: уксусная кислота:вода.

Данные литературы (табл. 1) были основой для дальнейшего экспериментального подбора условий хроматографического анализа. Состав мобильной фазы для проведения разделения определен путем варьирования соотношения растворителей в смеси бутанол:уксусная кислота:вода. В случае состава 5:3:2 аналитический сигнал аналита проявлялся ближе к линии фронта растворителя (рис. 1), при соотношении 65:18:28 наблюдали отделение ГАМК от линии фронта (рис. 2), фактор удерживания (R_f) составил около 0,6.



а



б

Рис. 1. Хроматограмма раствора стандартного образца (СО) ГАМК при соотношении компонентов мобильной фазы 5:3:2 (*а*) и 65:18:28 (*б*)

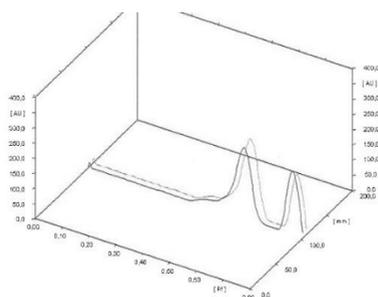


Рис. 2. Хроматограмма растворов СО ГАМК при использовании в качестве растворителя этанола

При выборе растворителя для приготовления растворов СО определяющим фактором стал фоновый сигнал (шум) на хроматограммах. Фоновый сигнал, наблюдаемый при использовании в качестве растворителя этанола (рис. 2), затруднял обсчет площадей пиков.

В случае использования метанола в качестве растворителя фоновый шум был менее значим, регистрируемые хроматографические пики лучше разделены (рис. 1, б).

На этапе дериватизации было принято решение включить в состав дериватизирующего агента (0,2% раствор нингидрина в ацетоне) пиридин, так как он оказал положительное влияние на воспроизводимость пиков при двух повторностях одной и той же пробы (RSD площадей пиков при использовании реагента без пиридина составили — 70,7% (рис. 1, а), с пиридином — 12,1%, рис. 1, б).

Таким образом, на основании анализа литературных данных (табл. 1) и собственных экспериментов были выбраны условия для выполнения хроматографического анализа: растворитель для растворов СО — метанол; мобильная фаза для проведения разделения бутанол:уксусная кислота:вода (б:у:в) в объемном соотношении 65:18:28; условия разделения: насыщение хроматографической камеры мобильной фазой 1 час, линия финиша — 80 мм; сушка: после разделения пластины высушивали на нагревателе пластин TCX CAMAG TLC Plate Heater 3 (CAMAG, Швейцария) при температуре 60–65 °С в течение 3–5 минут, после этапа дериватизации нагревали при температуре 75 °С в течение 15 минут; дериватизация: обработка 0,2% раствора нингидрина в ацетоне с добавлением пиридина; регистрация денситограмм: на спектроденситометре TLC Scaneer 3 (CAMAG, Швейцария) при длине волны 486 нм (соответствовала поглощению в области максимума поглощения аналита).

Для подготовки биопроб (получения гомогенатов головного мозга) рассматривали два варианта растворителей — растворитель 0,1 раствор соляной кислоты (а) и метанол (б). В варианте А анализ хроматограмм осложнен фоновым сигналом (рис. 3, а), в случае варианта Б интегрирование пиков на хроматограммах более корректное, наблюдали разделение компонентов проб до базовой линии (рис. 3, б). На данном этапе не удалось однозначно выбрать оптимальный растворитель для обработки биоматериала, поэтому в дальнейших экспериментах рассматривали два варианта методики.

Валидация ранее разработанных методик количественного определения ГАМК (табл. 1) не соответствовала современным регуляторным требованиям. При валидации двух рассматриваемых нами вариантов методики количественного определения ГАМК в гомогенате мозга крыс методом ВЭТСХ (с варьированием среды

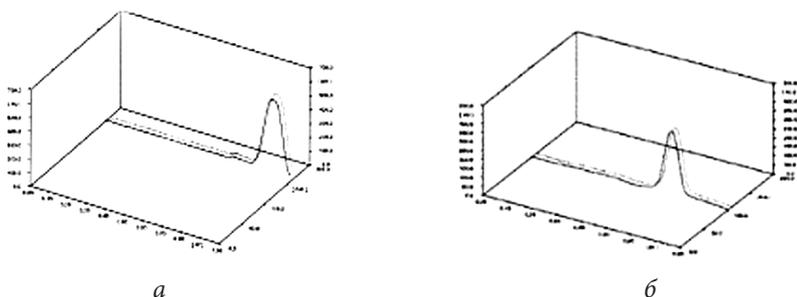


Рис. 3. Хроматограмма гомогената мозга крыс с добавкой ГАМК в двух вариантах получения гомогената (*a* — соляная кислота; *b* — метанол)

для гомогенизации биоматериала) согласно рекомендациям [8, 9] в диапазоне концентраций от примерно 565 до 4500 мкг/г по показателям: селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон, правильность (точность) и прецизионность, стабильность аналита установлено несоответствие критериям приемлемости по показателям правильность, прецизионность и стабильность аналита.

Сопоставление двух вариантов обработки исходного биоматериала для его гомогенизации не позволило выявить преимущества того или иного способа: в первом случае удалось получить менее разделенную хроматограмму, но более приемлемую картину по валидационным параметрам, а во втором варианте — более корректное интегрирование пиков на хроматограмме, но результаты ни для одного из валидационных параметров не соответствовали критериям приемлемости.

Минимальные концентрации, выбранные при оценке аналитического диапазона и линейности, не могут быть приняты в качестве НПКО, поскольку получены неудовлетворительные результаты по оценке правильности и прецизионности. Можно предположить, что для получения приемлемых результатов валидационных испытаний необходимо использовать более высокие концентрации, чем проверенные аналитические диапазоны. В то же время уровень ГАМК, ожидаемый у животных в нормальном и патологическом состоянии, по-видимому, лежит в области более низких концентраций (0,5 мкг/мг ткани головного мозга [10]). Результаты анализа проб интактного биоматериала животных без добавок целевого аналита свидетельствовали о присутствии ГАМК в головном мозге крыс. Однако все

значения площадей пиков были ниже значений, соответствовавших предполагаемому НПКО.

Таким образом, выбранный аналитический метод (ВЭТСХ на анализаторе САМАГ) и разработанные варианты методики не подходят для решения поставленной задачи по определению гамма-аминомасляной кислоты в головном мозге лабораторных животных в связи с высоким пределом обнаружения, и несоответствием современным валидационным требованиям.

Обобщая литературные данные и собственный экспериментальный опыт, можно отметить такие достоинства метода ВЭТСХ, как возможность неограниченного выбора и сочетания стационарной и подвижной фаз; параллельный анализ нескольких образцов на одной пластинке и ее однократное использование; сравнительная простота интерпретации результатов и умеренность затрат. К недостаткам применения метода ВЭТСХ в биоаналитических исследованиях можно отнести сравнительно низкую чувствительность метода, сложность воспроизводимости результатов, ограниченную длину разделения и низкую его эффективность, а также экологическую нагрузку (применение органических растворителей). В целом с учетом современных валидационных требований применение ВЭТСХ в биоаналитических исследованиях проблематично.

Список литературы

1. Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation // *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2015. P. 165-175.
2. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2018. 41 p.
3. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011. 22 p.
4. Carrasco-Nuñez N., Salinas M. C and Marisa Cabeza Salinas. HPTLC method for effective separation of L-glutamic acid and GABA present in brain tissue extracts // *Latin American Journal of Development*. 2022. T. 4. №. 6. P. 2060-2075.
5. Babu C.S. A simple densitometric method for the quantification of inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) in rat brain tissue // *Chromatography Research International*. 2011. T. 2011. P. 1-6.

6. Babu C. S., Sunil, A. G., Vasanthi, H. R., Muthusamy, V. S., & Ramanathan, Development and validation of an HPTLC method for simultaneous estimation of excitatory neurotransmitters in rat brain // Journal of liquid chromatography & related technologies. 2007. Т. 30. №. 19. P. 2891-2902

7. Jha S. V., Bhagwat A. M., Pandita N. S. Method development and validation of GABA using high-performance thin-layer chromatography in brain homogenate // JPC—Journal of Planar Chromatography—Modern TLC. 2013. Т. 26. P. 417-420.

8. Ramanathan M., Babu C. S., Justin A., Shanthakumari S. Elucidation of neuroprotective role of endogenous GABA and energy metabolites in middle cerebral artery occluded model in rats // Indian Journal of Experimental biology. 2012. Т. 50 — P.391-397.

9. Li H., Wang L., Nie L., Liu X., Fu J. Sensitivity intensified ninhydrin-based chromogenic system by ethanol-ethyl acetate: Application to relative quantitation of GABA // Metabolites. 2023. Т. 13. №. 2. 283 p.

10. Sancheti J. S., Shaikh M. F., Khatwani P. F., Kulkarni S. R., Sathaye S. Development and validation of a HPTLC method for simultaneous estimation of L-glutamic acid and γ -aminobutyric acid in mice brain // Indian journal of pharmaceutical sciences. 2013. Т. 75. №. 6. 716 p.

УДК 543.544.3:613.6:547.422.22-31

Лебединская К.С., Крымская Т.П., Чеботкова Д.В.

Республиканское унитарное предприятие

«Научно-практический центр гигиены»,

Минск, Республика Беларусь

chromatographic@rspch.by

**ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ОКИСИ ЭТИЛЕНА В ВОДНЫХ
ВЫТЯЖКАХ ИЗ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ,
СТЕРИЛИЗОВАННЫХ ОКИСЬЮ ЭТИЛЕНА**

Разработана методика газохроматографического определения остаточного содержания окиси этилена в водных вытяжках из изделий медицинского назначения, стерилизованных окисью этилена. Методика измерений предназначена для применения органами и учреждениями, осуществляющими государственный санитарный надзор и мониторинг в области санитарно-гигиенической оценки изделий медицинского назначения.

Ключевые слова: окись этилена, газовая хроматография, парофазный анализ, водная вытяжка, методика измерений.

Lebedinskaya K.S., Krymskaya T.P., Chebotkova D.V.
Republican Unitary Enterprise «Scientific Practical Centre Of Hygiene»,
Minsk, Republic of Belarus
chromatographic@rspch.by

GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ETHYLENE OXIDE RESIDUES IN AQUEOUS EXTRACTS FROM MEDICAL PRODUCTS, STERILIZED WITH ETHYLENE OXIDE

A method of gas chromatographic determination of the residual content of ethylene oxide in aqueous extracts from medical products sterilized with ethylene oxide has been developed. The measurement technique is intended for use by bodies and that carry out state sanitary supervision and monitoring in the field of sanitary and hygienic assessment of medical devices.

Keywords: ethylene oxide, gas chromatography, vapor phase analysis, water extraction, measurement technique.

Актуальность: Многие полимеры используются в качестве биоматериалов для изделий медицинского назначения благодаря их физико-химическим характеристикам и структурной универсальности. Однако их использование на теле человека или внутри него требует стерилизации, чтобы предотвратить микробное заражение и снизить риск отторжения или воспаления. Полимерные материалы характеризуются низкой термостойкостью, что требует стерилизации холодными методами, в частности газовым. Одним из стерилизующих газов является окись этилена.

Окись этилена (оксиран, этиленоксид, 1,2-эпоксигетан) — газообразный химический алкилирующий агент, мутагенный для растений, микроорганизмов и насекомых, широко используемый в качестве фунгицида при фумигации пищевых продуктов (фасованные крупы, рис, табак и т.д.), текстиля (одежда, меха и т.д.), книг, мебели, медицинского и научного оборудования. Этиленоксид поглощается этими объектами, но постепенно выводится через них в разное время, в зависимости от условий хранения после их стерилизации.

Очень важно знать и контролировать остаточное количество окиси этилена, поскольку этот газ хорошо известен как сильно токсичный [1, 2].

Для безопасности пациента важно, чтобы все изделия соответствовали ограничениям, установленным в ГОСТ ISO 10993-7. Допустимые значения будут варьироваться в зависимости от предполагаемого использования изделия.

Определению остаточных количеств окиси этилена в простерилизованных медицинских изделиях посвящен ряд работ, которые отличаются как процедурой экстракции, так и методами обнаружения.

Процедура извлечения этиленоксида может быть основана на нагревании стерилизованного этилен оксидом образца с помощью нагревательных камер и десорбцией этиленоксида поглотителями или твердофазными ловушками [3], с последующим определением колориметрическим [4] или газохроматографическим методами, твердофазной микроэкстракции [5] и выделении этиленоксида из стерилизованных образцов органическими растворителями с дальнейшей идентификацией методами тонкослойной хроматографии [6].

Однако проанализированные методы не соответствуют современным требованиям. Они имеют ряд недостатков: трудоемкость, длительность выполнения, применение токсичных органических растворителей, дорогостоящих реактивов и приборов.

Более современные подходы определения остаточного содержания оксида этилена в стерилизованном медико-хирургическом оборудовании основаны на газохроматографическом анализе в сочетании с отбором проб паровой фазы, сущность которого заключается в нагреве образцов с выделением в верхней части остаточного этиленоксида. Затем аликвоты паровой фазы анализируют с помощью газохроматографического анализа [7,8].

Парофазный хроматографический анализ является общепризнанным методом определения летучих веществ в самых разнообразных объектах любого агрегатного состояния [9].

Метод парофазного анализа является достаточно чувствительным, не требует длительной и трудоемкой процедуры пробоподготовки. Его использование позволяет повысить воспроизводимость результатов определения, уменьшить трудоемкость, стоимость, токсичность и погрешность анализа. Кроме того, газохроматографический метод с парофазным анализом обладает высокой чувствительностью определения этиленоксида.

В связи с этим для определения окиси этилена был выбран метод газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (далее — ПИД) и парофазным анализом.

Цель работы — разработка методики парофазного газохроматографического определения остаточных количеств окиси этилена в водных вытяжках из изделий медицинского назначения, стерилизованных окисью этилена с использованием ПИД.

Результаты и их обсуждение. Методика определения окиси этилена в водных вытяжках. Данный метод сочетает в себе статическую газовую экстракцию в замкнутом объеме и дальнейшем газохроматографическом анализе равновесной паровой фазы. В данном случае обеспечивается равновесное распределение определяемого вещества между конденсированной (вода) и газовой (водяной пар) фазами.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись модельные пробы, имитирующие водные вытяжки из стерилизованных окисью этилена медицинских изделий. В качестве модельных проб использовали пробы дистиллированной воды, содержащей окись этилена в массовых концентрациях на трех уровнях диапазона измерений:

- 1) уровень № 1 — окись этилена в концентрации 1,0 мг/дм³;
- 2) уровень № 2 — окись этилена в концентрации 4,0 мг/дм³;
- 3) уровень № 3 — окись этилена в концентрации 20,0 мг/дм³.

В ходе выполнения работ по разработке методики использовали аналитический стандарт окиси этилена 500 мкг/см³ в диметилсульфоксиде (далее — ДМСО) («Supelco», США).

Газохроматографический анализ проводили на аппаратно-программном комплексе хроматографа «Хроматэк-Кристалл 5000», оснащенный ПИД и дозатором равновесного пара (далее — ДРП). Разделение осуществляли программированием температурного градиента на кварцевой капиллярной колонке ДВ-624 длиной 60 м, внутренним диаметром 0,53 мм, со слоем неподвижной жидкой фазы из 6 % цианопропилфенила и 94 % диметилполисилоксана толщиной 3,0 мкм.

Температуру колонки программировали в следующем режиме: начальная температура 45 °С с выдержкой в течение 7 мин и далее до 220 °С со скоростью 50 °С/мин и выдержкой 3,5 мин. Время удерживания этиленоксида на капиллярной колонке ДВ-624 — 4,24 мин.

Значение нижнего предела обнаружения для окиси этилена с использованием ПИД-детектора, при условиях, описанных в таблице 1, составляет 1 мг/дм³.

Необходимые режимы работы хроматографа и ДРП для определения окиси этилена представлены в таблице 1.

Таблица 1. Условия работы ДРП и условия хроматографирования

Условие	Значение
<i>Параметры хроматографа</i>	
Газ-носитель	Азот, постоянное давление 52,6 кПа
Температура испарителя	250 °С
Температура детектора (ПИД)	250 °С
Расход водорода	40 см ³ /мин
Расход воздуха	400 см ³ /мин
Температурный режим	45 °С (7 мин); 50 °С /мин до 220 °С (3,5 мин)
<i>Параметры дозатора равновесного пара</i>	
Вспомогательный газ	Азот
Время термостатирования виалы с пробой	40 мин
Температура термостата виалы с пробой	80 °С
Температура переходной линии	120 °С
Избыточное давление в виале	0,07 МПа
Время инъекции	10 с
Объем вводимой дозы равновесного пара	1–2 см ³
Общее время анализа	25,2 мин
Время удерживания	ДВ-624 — 4,24 мин

Приготовление градуировочных растворов. Рабочий раствор окиси этилена концентрацией 50 мг/дм³ в воде готовят из исходного раствора окиси этилена в ДМСО концентрацией 500 мкг/см³ путем разбавления дистиллированной водой.

Установление градуировочной характеристики. Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади хроматографического пика (условные единицы) от массовой концентрации окиси этилена в растворе (мг/дм³), устанавливали по пяти сериям из пяти градуировочных растворов окиси этилена (рис. 1). Концентрации градуировочных растворов составили 1,0 мг/дм³; 2,0 мг/дм³; 4,0 мг/дм³; 10 мг/дм³; 20 мг/дм³. Коэффициент корреляции составил 0,99, что свидетельствует о линейности методики в выбранном диапазоне концентраций.

Приготовление водной вытяжки из медицинских изделий. Образцы заливают дистиллированной водой и выдерживают при определен-

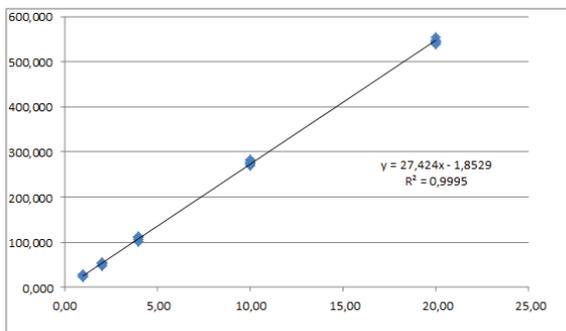


Рис. 1. Градуировочный график зависимости массовой концентрации окиси этилена от площади пика в растворе

ной экспозиции и определенном температурном режиме. Режимы моделирования и экспозиции зависят от вида медицинских изделий, контактирующих с пациентом и регламентированы ГОСТ ISO 10993-7, ГОСТ ISO 10993-12.

Водные вытяжки из медицинских изделий переносят в вials для парофазного анализа, содержащую 1 г безводного сернокислого натрия, герметизируют специальной крышкой, помещают в ДРП и проводят измерения при условиях, представленных в таблице 1.

По окончании хроматографирования идентифицировали пик окиси этилена по времени удерживания и вычисляли его массовую концентрацию по предварительно построенному градуировочному графику с помощью программного обеспечения «Хроматэк Аналитик».

За результат измерения принимают среднее арифметическое двух параллельных измерений \bar{X} , которое вычисляют по формуле:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (1)$$

где X_1, X_2 — значения массовых концентраций окиси этилена в каждой из двух проб параллельных измерений, мг/дм³.

Проведен набор экспериментальных данных и рассчитаны метрологические характеристики методики. Установлены следующие показатели точности методики: предел повторяемости — 23 %; предел промежуточной прецизионности — 35%; относительная расширенная неопределенность — 28 % при доверительной вероятности $P=0,95$ в диапазоне от 1,0 до 20 мг/дм³, показатели правильности незначимо отличаются от единицы.

Заключение. Разработана метрологически аттестованная методика выполнения измерений МВИ.МН 6332-2020 «Массовая концентрация ацетальдегида и окиси этилена в водных вытяжках из изделий медицинского назначения, стерилизованных окисью этилена», свидетельство об аттестации № 1208 от 29.01.2020. Данная методика с высокой степенью достоверности и точности позволяет осуществлять контроль безопасности при мониторинге в области санитарного надзора и санитарно-гигиенической оценки изделий медицинского назначения.

Список литературы

1. Этиленоксид: [сайт]. URL: <https://www.ilo.org>
2. Этиленоксид: [сайт]. URL: <https://www.epa.gov>
3. Mogenhan J., Whitbourne J., Ernst R. Determination of Ethylene Oxide in Surgical Materials by Vacuum Extraction and Gas Chromatography // Journal of pharmaceutical sciences. 1971. Vol. 60. P.222-224. DOI: 10.1002/jps.2600600213.
4. Shintani, Hideharu, Ōbō, Colorimetric Determination of Residual Ethylene Oxide on Medical Devices // Eisei kagaku. 1981. Vol. 27. P. 224-230. DOI: 10.1248/jhs1956.27.224.
5. Shih-Wei T., Shih Ting T., Ven-Shing V., Jim-Shoung L. Laboratory and field validations of a solid-phase microextraction device for the determination of ethylene oxide // Journal of chromatography. 2004. V. 1026. P. 25-30. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.10.088.
6. Brown, Daniel. Determination of Ethylene Oxide and Ethylene Chlorohydrin in Plastic and Rubber Surgical Equipment Sterilized with Ethylene Oxide // Journal of AOAC INTERNATIONAL. 1970. Vol. 53. P. 263-267. DOI: 10.1093/jaoac/53.2.263.
7. Galle J.C., Prud'hon C., Plasse J.C. Determination of residual ethylene oxide in medico-surgical equipment // Sciences Techniques et Pratiques Pharmaceutiques. 1985. Vol. 1. P. 184-188.
8. Tegewa. Determination of monomeric ethylene oxide in pharmaceutical raw materials // Fresenius Journal of Analytical Chemistry. 1989. Vol. 333. P. 26-28. DOI: 10.1007/BF00572612.
9. Витенберг А.Г. Статический парофазный газохроматографический анализ. Физико-химические основы и области применения // Рос. хим. ж. [Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева]. 2003. № XLVII, № 1. С. 7–22.

УДК 577.218

Мисник Е.В.¹, Эльдиб А.А.^{1,2}, Колпащиков Д.М.³

¹*Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

²*Альметьевский государственный нефтяной институт, Альметьевск*

³*Университет центральной Флориды, Орlando, США*

misnik@scamt-itmo.ru

ГИБЕЛЬ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

В работе представлен анализ библиотеки антисмысловых олигонуклеотидов в отношении клеточной линии аденокарциномы яичника SKOV-3. В результате двух этапов селекции были выявлены потенциальные гены-мишени.

Ключевые слова: *антисмысловые олигонуклеотиды, аденокарцинома яичника, клеточная линия SKOV-3.*

Misnik E.V.¹, Eldeeb A.A.^{1,2}, Kolpashchikov D.M.³

¹*SCAMT Institute, ITMO University, St. Petersburg*

²*Almetyevsk State Oil Institute, Almetyevsk*

³*University of Central Florida, Orlando, USA*

OVARIAN ADENOCARCINOMA CELL DEATH INDUCED BY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES

In the present study, we analyzed library of antisense oligonucleotides for the human ovarian adenocarcinoma cell line SKOV-3. As a result of two stages of selection, potential target genes were identified.

Keywords: *antisense oligonucleotides, ovarian adenocarcinoma, SKOV-3 cell line.*

Одним из перспективных направлений в генной терапии являются технологии на основе нуклеиновых кислот. Наиболее успешной из них является технология на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСО). Это обусловлено рядом причин: АСО препараты были одобрены FDA и ЕМА и применяются для лечения различного спектра заболеваний [1, 2]; несколько ведущих фармацевтических компаний активно проводят клинические испытания новых лекарств данной группы [3]; эффективность этого класса веществ общепризнана научным сообществом.

Как известно, АСО представляют собой короткие ДНК-подобные последовательности, которые специфически связываются с целевой мРНК посредством принципа комплементарности. Данный дуплекс

ДНК-РНК активизирует внутриклеточную РНКазу H, которая приводит к его расщеплению. Такой механизм действия предотвращает синтез белка, который участвует в развитии заболевания [4]. Анализ опыта применения лекарственных средств на основе АСО позволил предположить, что технология манипуляции генами может быть применима при лечении онкологических заболеваний.

Стоит отметить, что одобренных препаратов на основе АСО для лечения онкологии в настоящее время не существует. Мы предполагаем, что это в значительной степени связано с неправильным выбором мишеней для терапии. Мы сформулировали следующую гипотезу: подавление генов, выполняющих важную функцию в клетках, приводит к активации апоптоза, что в конечном итоге приводит к гибели клеток. Данное решение позволит положить основу высокоэффективным цитотоксическим препаратам.

Был проведен систематический подбор целевых генов для исследования при помощи литературы и баз данных (DerMap и OGEE). Учитывались такие факторы, как доступность гена для таргетирования, а также уровень экспрессии в различных клеточных линиях. Таким образом, были выделены потенциальные кандидаты для дальнейших исследований: DHX8, DHX9, CSE1L, DARS1, DHPS, COPB1, AP2M1, DYNC1I2, EEF1A1, EEF2, EIF2S1, EIF2S3 и PSMB2. Следующим этапом было изучение вторичной структуры мРНК, биоинформатический анализ позволил обнаружить наиболее открытые участки для создания нескольких дизайнов для каждого гена, что позволит повысить вероятность связывания АСО с таргетом. Кроме того, олигонуклеотиды должны соответствовать следующим требованиям: длина 15–20 нуклеотидов, процент Г/Ц 40–65% и температура плавления находится в диапазоне 55–70°С. Добавление тиофосфатных модификаций позволило предотвратить деградацию АСО внутриклеточными нуклеазами. В итоге было создано 38 дизайнов олигонуклеотидов для последующего отбора.

Первичный скрининг позволил определить цитотоксическое действие АСО после трансфекции их в клетки. В эксперименте использовалась адгезионная клеточная линия аденокарциномы яичника — SKOV-3. Жизнеспособность клеток оценивалась с использованием МТТ-теста — колориметрического анализа, основанного на способности никотинамид-β-аденин динуклеотид фосфат (НАДФ-Н)-зависимых клеточных ферментах преобразовывать тетразолиевый краситель в нерастворимые кристаллы формазана характерного фиолетового цвета [5].

Для культивации клеток использовалась среда ДМЕМ с добавлением эмбриональной сыворотки (10%) и антибиотика Гентамицина. За 24 ч до эксперимента, клетки были высеяны в 96-луночные планшеты с плотностью 5×10^3 клеток/луночка для инкубации в течение 24 часов и 4×10^3 клеток/луночка для инкубации в течение 48 часов. После прикрепления клеток производилась трансфекция нуклеиновых кислот путем липосомальной доставки (Molecta, Россия) с финальной концентрацией 250 нМ. Контрольные образцы включали лунки без липосомального премикса и без АСО. С целью повышения эффективности трансфекции была использована ростовая среда без добавления антибиотика. После инкубации 24–48 ч оценивалась метаболическая активность клеток. Для этого был внесен раствор МТТ (5 мг/мл) в объеме 10% от конечного объема с последующей инкубацией 3 ч в CO_2 инкубаторе. После удаления надосадка, кристаллы формазана были растворены в ДМСО. Анализ оптического поглощения проводили на планшетном спектрофотометре (Spark Tescan, Швейцария) при значениях длины волны 570 нм. Далее процент живых клеток определялся как отношение поглощения в экспериментальной лунке к контрольной с вычетом базовой линии, а именно поглощение соответственного объема ДМСО.

Результаты трех независимых экспериментов показали наиболее цитотоксичные АСО, максимально снизившие процент жизнеспособных клеток после 24 и 48 ч инкубации (рис. 1).

Для вторичной селекции был проведен анализ уровня внутриклеточных эстераз, уровень активности которых сигнализирует

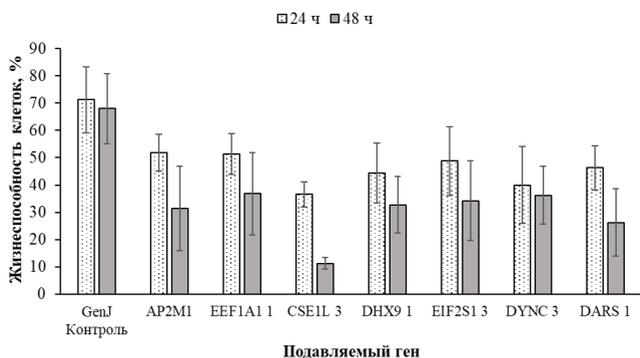


Рис. 1. Оценка жизнеспособности клеток SKOV-3 после трансфекции АСО через 24 и 48 ч инкубации при финальной концентрации 250 нМ. По оси абсцисс — подавляемые гены; по оси ординат — процент живых клеток

о клеточном стрессе. Для этого использовался флуоресцентный краситель Calcein AM (Invitrogen, США), который способен проникать свободно через клеточную мембрану и при гидролитическом взаимодействии с ферментами образует кальцеин, который способен оставаться внутри клеток.

Условия культивации клеток аналогичны описанным ранее. Для эксперимента клетки высевали в 24-луночный планшет в количестве 2×10^4 клеток/лунку. Трансфекция нуклеиновых кислот проводилась с финальной концентрацией 250 и 100 нМ после 24 ч инкубации. Анализ проводился с помощью проточной цитометрии (CytoFlex Beckman Coulter, США) в канале FITC.

Результаты эксперимента показали, что АСО для генов DYNC112 и DARS1 оказались наиболее токсичными для раковых клеток. Уровень клеточного стресса достиг 43% при концентрации 100 нМ и 65% при 250 нМ (рис. 2).

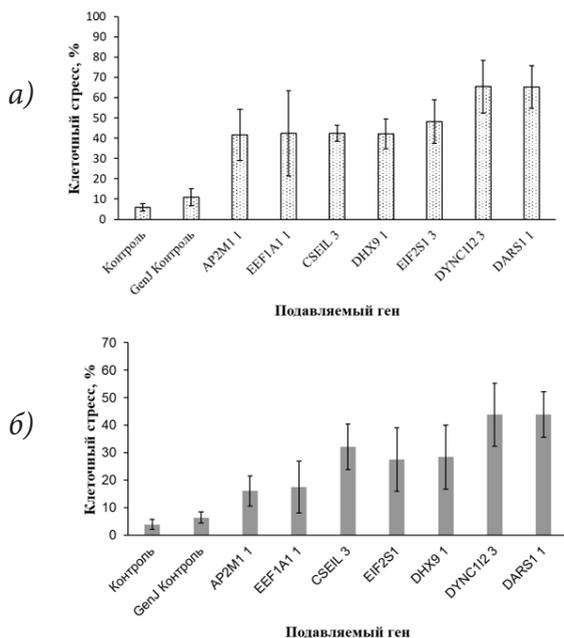


Рис. 2. Оценка снижения метаболической активности клеток SKOV-3 после трансфекции АСО через 24 ч инкубации при финальной концентрации: *a* — 250 нМ; *б* — 100 нМ. По оси абсцисс — подавляемые гены; по оси ординат — процент клеточного стресса

Высокая эффективность при сравнительно низких концентрациях свидетельствует о критической важности функции упомянутых генов и об рациональности дизайна АСО.

Таким образом, в ходе исследования были получены два потенциальных терапевтических агента. В дальнейшем скрининг библиотеки АСО будет применен для более широкого числа клеточных линий, а также подробно изучены механизмы клеточной гибели.

Данная работа выполнена при поддержке федеральной программы «Приоритет 2030».

Список литературы

1. Kim YJ, Sivetz N, Layne J, Voss DM, Yang L, Zhang Q, Krainer AR. Exon-skipping antisense oligonucleotides for cystic fibrosis therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Jan 18.

2. Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. Mol Ther. 2017 May 3;25(5):1069-1075.

3. База данных клинических исследований, финансируемых частными и государственными учреждениями, проведенных по всему миру URL: <https://classic.clinicaltrials.gov/> (Дата обращения к ресурсу: 03.09.23)

4. Bajan S., Hutvagner G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. Cells 2020, 9, 137.

5. Ghasemi M., Turnbull T., Sebastian S., Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 12827.

УДК 615.074

*Никанорова И.Е., Цыганкова Е.П., Башар М.Ю.
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный
медицинский университет» Минздрава России,
Ростов-на-Дону
chem.12@yandex.ru*

КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКТИВНЫХ ИНДИКАТОРНЫХ БУМАГ, ИМПРЕГНИРОВАННЫХ МЕТИЛОВЫМ ОРАНЖЕВЫМ

Предложена методика определения концентрации хлорида натрия в физиологическом растворе без использования нитрата серебра. Значительное снижение стоимости реагентов является важным аспектом при проведении массовых анализов в производственном контроле.

***Ключевые слова:** физиологический раствор, хлориды, индикаторные бумаги, газовая экстракция, колориметрия.*

*Nikanorova I.E., Tsygankova E.P., Bashar M.Yu.
FSBEI HE «Rostov State Medical University»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Rostov-on-Don*

SALINE PRODUCTION CONTROL USING REACTIVE INDICATOR PAPERS, IMPREGNATED WITH METHYL ORANGE

A method for determining the concentration of sodium chloride in a physiological solution without the use of silver nitrate is proposed. A significant reduction in the cost of reagents is an important aspect when conducting mass analyzes in production control.

Keywords: *saline, chlorides, indicator papers, gas extraction, colorimetry.*

Физиологический раствор (водный раствор натрия хлорида с массовой долей $\omega(\text{NaCl})=0,9\%$) широко используется в медицинской практике для инъекций, ингаляций и т.д. Как и все фармацевтические препараты, допущенные к применению, его качество подвергается обязательному контролю по методикам, приведенным в Государственной фармакопее [1]. Для препаратов, содержащих хлорид-ион, предусмотрено аргентометрическое титрование по методу Мора. Метод прост в исполнении, но является достаточно дорогостоящим в связи с использованием нитрата серебра в качестве титранта. Поэтому поиск альтернативных методик, позволяющих снизить стоимость анализа, является актуальной задачей.

Целью настоящей работы являлось изучение возможности определения хлорид-ионов в физиологическом растворе с использованием газовой экстракции хлора и реактивной индикаторной бумаги (РИБ), модифицированной метиловым оранжевым. Ранее данные РИБ и аналогичные индикаторные средства были успешно применены в анализе объектов окружающей среды и некоторых пищевых продуктов [2-10]. Методика изготовления РИБ описана в работе [2] и реализуется в лабораторных условиях с использованием доступных реагентов.

Определение проводится в реакционной системе [1] (см. рисунок 1) по следующей схеме:

– аликвота анализируемого раствора объемом 0,5 мл помещается в реакционный сосуд, добавляются серная кислота и перманганат калия, в индикаторное устройство вставляется полоска РИБ, включается микрокомпрессор и проводится газовая экстракция образующегося хлора (20 мин);

- после завершения экстракции полоска РИБ извлекается и сканируется на офисном сканере;
- окраска реакционной зоны РИБ, которая изменяется от розовой до белой в зависимости от концентрации хлорида натрия, описывается координатами цвета в системе RGB с использованием программы Adobe PhotoShop;
- по предварительно построенному на модельных растворах градуировочному графику определяется концентрация хлорида натрия в анализируемом растворе.

Апробацию методики проводили на различных партиях препарата трех российских производителей. Данные представлены в таблице 1 и демонстрируют хорошую сходимость результатов с контрольным методом.



Рис. 1. Реакционная система в процессе проведения газоэкстракционного определения хлорида натрия

Таблица 1. Результаты анализа физиологического раствора
цветометрическим и титриметрическим методами
($n=5$; $P=0.95$; $F_{\text{теор}}=6.59$; $t=2.78$)

Образец	Определено NaCl, ω , %						Fэксп
	Цветометрия			Титриметрия			
	$\bar{X} \pm \delta$	Δ (%)	Sr	$\bar{X} \pm \delta$	Δ (%)	Sr	
1	0,91±0,02	2,2	0,018	0,89±0,03	3,3	0,027	2,25
2	0,88±0,02	2,3	0,028	0,86±0,02	1,1	0,018	2,78
3	0,91±0,03	3,3	0,026	0,92±0,04	4,3	0,035	1,78

По метрологическим характеристикам разработанная методика не уступает аргентометрии и может быть рекомендована для контроля производства физиологического раствора. Общее время единичного определения составляет 30 минут, что превышает время титриметрического определения. Однако основным достоинством методики является её экономичность благодаря исключению дорогостоящего нитрата серебра: расходы сокращаются в 105 раз. Это особенно важно при проведении массовых анализов в контроле фармацевтического производства.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание, в 4 томах. М., 2018. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmasorea14> (дата обращения 02.09.2023).
2. Горбунова М.О., Кононова А.Ю., Втулкина В.Э. Экстракционное визуально-тестовое и цветометрическое определение хлора в воде с использованием реактивной индикаторной бумаги, импрегнированной метиловым оранжевым // Вода: химия и экология. 2014. №12 (78). С. 76-80.
3. Gorbunova M.O., Baulina A.A., Garshina M.S., Shevchenko A.V., Kulyaginova M.S., Apyari V.V., Furlotov A.A., Dmitrienko S.G., Zolotov Y.A. An improved step-by-step airflow/paper-based colorimetric method for highly selective determination of halides in complex matrices // Talanta. 2020. T. 219. С. 121254.
4. Горбунова М.О., Жихарева И.Н. Тест-метод определения активного хлора в питьевой воде // Журнал аналитической химии. 2003. Т. 58. № 7. С. 741.

5. Горбунова М.О., Кононова А.Ю., Втулкина В.Э. Индикаторный порошок использованием метилового оранжевого для визуально тестового определения свободного хлора в воде // Вода: химия и экология. 2014. № 3 (69). С. 84-88.

6. Горбунова М.О., Баян Е.М., Войциховская Е.В. Глюкотест для контроля качества продовольственного сырья и пищевых продуктов // Журнал аналитической химии. 2010. Т. 65. № 11. С. 1224-1228.

7. Горбунова М.О., Баян Е.М., Могучих Е.А. Экспресс-диагностика экологического состояния водоемов // В сборнике: Вопросы сохранения биоразнообразия водных объектов: материалы Международной научной конференции. Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства (ФГБНУ «АзНИИРХ»). 2015. С. 80-84.

8. Князева Т.В., Горбунова М.О., Черная Г.О. Определение меди в напитках // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2000. № 2-3 (255-256). С. 90-92.

9. Апяри В.В., Фурлетов А.А., Гаршев А.В., Волков П.А., Горбунова М.О., Шевченко А.В. Получение реактивных индикаторных бумаг с треугольными нанопластинками серебра для химического анализа // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2017. Т. 58. № 4. С. 170-177.

10. Gorbunova M.O., Garshina M.S., Kulyaginova M.S., Apyari V.V., Furletov A.A., Garshev A.V., Dmitrienko S.G., Zolotov Y.A. A dynamic gas extraction-assisted paper-based method for colorimetric determination of bromides // Analytical Methods. 2020. Т. 12. № 4. С. 587-594.

УДК 378:001.891, 541.13

Попов А.С., Иванова И.С.

*ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург
aleksei.popov@szgmu.ru*

**МНОГОВАРИАНТНОСТЬ
ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ
КАК СЛЕДСТВИЕ ОТСУТСТВИЯ ОГРАНИЧЕНИЙ НА УСЛОВИЯ
ИХ ПРОТЕКАНИЯ**

Рассмотрена смесь нескольких потенциальных окислителей, восстановителей и индифферентных веществ. Произведен анализ возможных окислительно-восстановительных процессов. Зависимость электродного потенциала от рН водного раствора получена с исполь-

зованием уравнения Нернста. Численно получены решения системы уравнений для выявленных процессов с участием одного окислителя и одного восстановителя во всем диапазоне pH. Показано, что отсутствие ограничений на протекание реакций приводит к множественным продуктам и неоднозначности конечного результата процессов.

Ключевые слова: окислительно-восстановительная реакция, электродный потенциал, уравнение Нернста, константа равновесия, ЭДС, равновесная концентрация.

Popov A.S., Ivanova I.S.

*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg*

MULTIVARIANCE OF REDOX REACTIONS AS A CONSEQUENCE OF THE ABSENCE OF RESTRICTIONS ON THE CONDITIONS OF THEIR COURSE

Mixture of several potential oxidizing agents, reducing agents and indifferent substances is considered. The analysis of possible redox processes is carried out. The dependence of the electrode potential on the pH of the aqueous solution is obtained using the Nernst equation. Solutions of a system of equations for the identified processes involving one oxidizer and one reducing agent in the full pH range are numerically obtained. It is shown that the absence of restrictions on the conditions of the reactions leads to multiple products and ambiguity of the final result of the processes.

Keywords: redox reaction, electrode potential, Nernst equation, equilibrium constant, EMF, equilibrium concentration.

Окислительно-восстановительные реакции (ОВР) как процессы, протекающие с переносом электронов, выделяются среди других химических превращений специфическими механизмами и большими тепловыми эффектами, а также возможностью достаточно точно рассчитать изменение свободной энергии на основе электродных потенциалов. Связь ΔE^0 — электродвижущей силы (ЭДС) с константой равновесия K позволяет составить математические системы уравнений, аналитическое или числовое решение которых дает значения концентраций реагентов и продуктов, которые соответствуют концентрациям в реальном эксперименте. В настоящей работе математический алгоритм решения систем уравнений применен для анализа возможных ОВР и соответствующих продуктов в случае исходной смеси, содержащей калий(I) перманганат, калий(I)

гидрофосфат, барий (II) бромид, медь (II) карбонат, бромоводород, фосфин и вода [1]. Ограничения на условия реакций не накладывались. Отметим, что эффективными способами создания стимуляционно-мотивирующих ситуаций при изучении окислительно-восстановительных процессов (ОВР) являются химический эксперимент и познавательные задания [2, 3].

Необходимо указать, что на протекание ОВР и на значение электродного потенциала оказывает влияние температура, концентрация, давление и кислотно-щелочной характер среды. Значительные изменения электродные потенциалы претерпевают при протекании процессов в водных растворах. В таком случае необходимо указать, что агрегатное состояние веществ. Примем допущение, что соли — твердые вещества, но в случае бромоводорода и фосфина необходимо указать значение давления, по умолчанию примем давление стандартное — 1 атм. Опишем необходимые для расчета физико-химические характеристики реагентов, способных к ОВР.

Калия перманганат. Окислитель, свойства которого значительно зависят от агрегатного состояния и от pH водного раствора. Запишем возможные превращения марганца. Влияние активностей ионов, в частности pH и парциального давления газа, рассчитывается по уравнению Нернста для окислительно-восстановительного электрода первого рода. Приведены аналитические уравнения Нернста только для тех процессов, которые могут иметь значение в исследуемой смеси веществ [4].

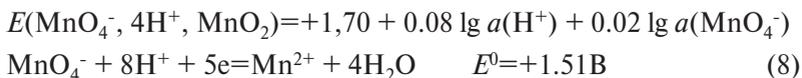
В кислой среде, pH 0-5:

В кислой среде, pH 0-5:



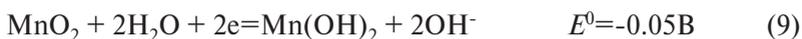
$$E(\text{MnO}_4^-, \text{MnO}_4^{2-}) = +0.56 + \frac{RT}{F} \ln a(\text{MnO}_4^-) - \frac{RT}{F} \ln a(\text{MnO}_4^{2-}) = \\ = \mathbf{0.06} \lg a(\text{MnO}_4^-) - 0.06 \lg a(\text{MnO}_4^{2-})$$





$$E(\text{MnO}_4^-, 5\text{H}^+, \text{Mn}^{2+}) = +1,51 + 0,048 \lg a(\text{H}^+) + 0,012 \lg a(\text{MnO}_4^-) - 0,06 \lg a(\text{Mn}^{2+})$$

В щелочных растворах pH 9-14:



Фосфин PH_3 , Восстановитель, окисляется на воздухе и образует с воздухом взрывчатые смеси [5]. В отличие от аммиака не образует водородных связей и незначительно растворим в воде. Показатель константы диссоциации фосфина как кислоты в водном растворе $pK_a \sim 29$, как основания $pK_b \sim 26$, следовательно фосфин не проявляет ни кислотных, ни основных свойств, но его потенциал значительно зависит от кислотно-щелочного характера раствора:

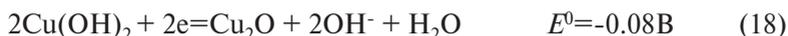


$$E(\text{P}, 3\text{H}^+, \text{PH}_3) = +0,06 - 0,02 \lg p(\text{PH}_3) + 0,06 \lg a(\text{H}^+)$$



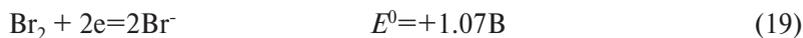
$$E(\text{P}, \text{PH}_3) = -0,89 + 0,02 \lg p(\text{PH}_3) - 0,06 \lg a(\text{OH}^-)$$

Для меди с различными степенями окисления:



Есть информация об изменении потенциала меди в присутствии различных анионов.

Бромоводород при давлении 1 атм. и температуре 25°C — это газ с плотностью 3,307 г/л, однако давление насыщенного пара составляет 2.303 МПа (21°C), поэтому отсутствие ограничений на давление в реакторе приводит к неоднозначным результатам расчета. Восстановитель, с энергией ионизации 11,62 эВ [6]. Водный раствор бромоводорода является сильной кислотой $pK_a \sim -9$. Укажем полуреакции бромид-иона, имеющие значение в настоящем исследовании:



$$E(\text{Br}_2, 2\text{Br}^-) = +1.07 - 0.06 \lg a(\text{Br}^-)$$

в кислотном растворе:



в щелочном растворе:



$$E(\text{BrO}_3^-, \text{Br}^-) = +0.61 + 0.01 \lg a(\text{BrO}_3^-) - 0.01 \lg a(\text{Br}^-) - 0.06 \lg a(\text{OH}^-)$$



$$E(\text{BrO}^-, \text{Br}^-) = +0.76 + 0.01 \lg a(\text{BrO}^-) - 0.03 \lg a(\text{Br}^-) - 0.06 \lg a(\text{OH}^-)$$

Для карбонат-иона укажем процесс:



Фосфат ионы в кислой среде:



и в щелочной:



Существенные процессы с участием кислорода в кислой среде:



$$E(\text{H}^+, \text{H}_2) = \frac{RT}{F} \ln \frac{a(\text{H}^+)}{\sqrt{p(\text{H}_2)}} = 0.06 \lg a(\text{H}^+) - 0.03 \lg p(\text{H}_2)$$



$$E(\text{O}_2, \text{H}^+) = +1.23 + \frac{RT}{F} \ln a(\text{H}^+) + \frac{RT}{F} \ln p(\text{O}_2) = 1.23 + 0.06 \lg a(\text{H}^+) + 0.06 \lg p(\text{O}_2)$$

В щелочной:



$$E(\text{O}_2, \text{OH}^-) = +0.40 + \frac{RT}{F} \ln \sqrt[4]{p(\text{O}_2)} - \frac{RT}{F} \ln a^4(\text{OH}^-) = 0.4 + 0.015 \lg p(\text{O}_2) - 0.24 \lg a(\text{OH}^-)$$

На рис. 1 в графическом виде представлены изменения электродных потенциалов окислителей и восстановителей в зависимости от рН.

Протекание ОВР следует характеризовать константой равновесия, которая связана со стандартным значением ЭДС (ΔE^0) известным соотношением:

$$\Delta E^0 = \frac{RT}{zF} \ln K, \text{ или } \lg K = \frac{z}{0.0591} \Delta E^0 \quad (31)$$

Работа окислительно-восстановительного процесса выразится:

$$W = RT \ln K + RT \ln \prod_i a = 41273 z \Delta E^0 + 2476 \lg \prod_i a \quad (32)$$

где $\prod_i a$ — произведение текущих концентраций участников реакции, z — число электронов в сбалансированной реакции [7].

Расчет концентраций возможных продуктов ОВР произведен путем решения систем уравнений, включающих уравнения Нернста для полуреакций (5,7,8,12,13,22,23,29,30), разбитых попарно окислитель + восстановитель и уравнения (32). Для упрощения расчета, протекание одновременно нескольких ОВР исключалось [8]. Результаты представлены на рис. 2.

Следовательно, можно сделать вывод, что отсутствие ограничений на протекание реакций при конкретных значениях рН только для процессов в водных растворах (возможны и гетерогенные процессы без участия воды) приводит к многочисленным конкурирующим ОВР, множественным продуктам и неоднозначности конечного результата процессов.

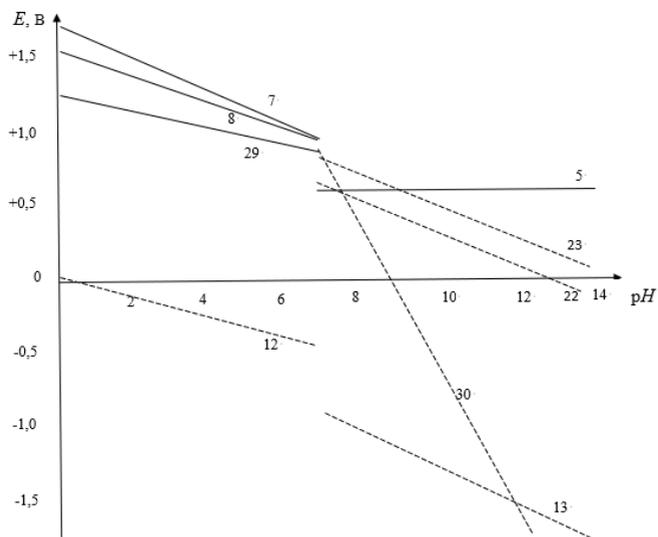


Рис. 1. Зависимость значения электродного потенциала E от значения рН. Окислители показаны сплошными линиями, восстановители — пунктирными, номера соответствуют тексту

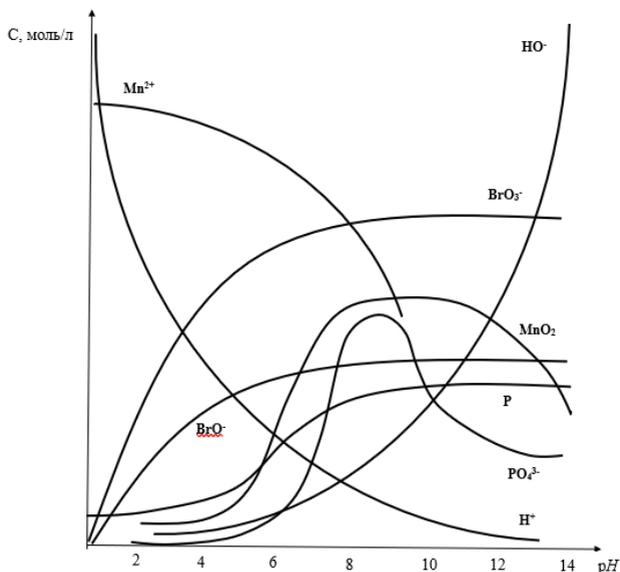


Рис. 2. Зависимость относительной молярной концентрации продуктов парных ОВР от pH водного раствора

Список литературы

1. Доронькин В.Н., Февралева В.А. ЕГЭ Химия. 10-11 классы. Раздел «Неорганическая химия». Задания и решения. Легион, 1922. С. 214.
2. Витязева О.В., Гавронская Ю.Ю. Проблемы мотивации в обучении химии студентов ГУМРФ им. адм. С.О. Макарова // Актуальные проблемы химического образования в средней и высшей школе: сборник научных статей / редкол.: Е.Я. Аршанский (гл. ред.) [и др.]. Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2016. С. 205-207.
3. Лямин, А. Н. Оптимизация обучения студентов химии в медицинском университете и преемственность довузовской подготовки школьников/А. Н. Лямин. Текст: электронный // Актуальные вопросы подготовки современных медицинских кадров: материалы межрегиональной учебно-методической конференции 18 мая 2023 года / Под ред. Е. Н. Касаткина, Н.С. Семено, Н.Л. Никулиной. Ки-

ров: ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России, 2023. 355 с. С. 240-248.

4. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Изд. Химия, 1989. 448 с.

5. Егоров А.С.. Репетитор по химии. Феникс, 2017. С. 441.

6. Неорганическая химия. В 3 т. / Под ред. Ю. Д. Третьякова. М.: центр «Академия», 2004. Т. 2. 368 с.

7. Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Цирлина Г.А. Электрохимия. 2-е изд. М.: Химия, КолосС, 2006. 672 с.

8. Блинов Л.Н., Крылов Н.И., Хватов Ю.А. Методы математических вычислений в понятиях и законах химии. // Материаловедение. Энергетика. 2022. Т. 28., С. 18-28.

УДК 637.07

*Сибирцев В.С.¹, Зайцева А.Ю.², Пономарев Н.Д.^{1,2},
Передкова В.Е.^{1,2}*

*¹Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет,
Санкт-Петербург, vs1969r@mail.ru*

*²Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург, anna@da-24.ru*

МУЛЬТИСЕНСОРНАЯ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКАЯ СИСТЕМА АНАЛИЗА СЛОЖНЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СМЕСЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКО- И НИЗКОСЕЛЕКТИВНОГО ЖЕЛЕЗНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Показано, что даже достаточно простая потенциометрическая система, состоящая всего из двух измерительных электродов (мембранного, селективного на Fe^{3+} ионы, и низкоселективного железного «электрода 1-го рода») и одного хлорсеребряного электрода сравнения, может быть использована для достаточно тонкого анализа состава таких сложных многокомпонентных смесей, какой является молоко (представляющее собой пример одной из широко распространённых биологических жидкостей, анализ которых весьма важен в современной диагностической медицинской практике; а кроме того являющееся одной из важных составляющих питания человека).

Ключевые слова: *потенциометрия, многокомпонентные смеси, мультисенсорные системы.*

*Sibirtsev V.S.¹, Zaitseva A. Yu.², Ponomarev N.D.^{1,2},
Peredkova V.E.^{1,2}*

*¹St. Petersburg state chemical and pharmaceutical university,
St. Petersburg*

*²Institute of analytical instrumentation RAS,
St. Petersburg*

MULTISENSORY POTENTIOMETRIC SYSTEM FOR ANALYSIS OF COMPLEX MULTICOMPONENT MIXTURES USING HIGH AND LOW SELECTIVE IRON ELECTRODES

It has been shown that even a fairly simple potentiometric system, consisting of only two measuring electrodes (a membrane selective for Fe^{3+} ions, and a low-selective iron «electrode of 1st kind») and one silver chloride reference electrode, can be used for a fairly detailed analysis of the composition of such complex multicomponent mixtures, such as milk (which is an example of one of the widespread biological fluids, the analysis of which is very important in modern diagnostic medical practice; and in addition, it is one of the important components of human nutrition).

Keywords: *potentiometry, multicomponent mixtures, multisensory systems.*

В последнее время наметилась отчетливая тенденция к возрастанию роли сенсоров в решении самых разнообразных задач химического анализа [1, 2]. Одной из таких задач является оценка качества пищевой продукции, поскольку это напрямую влияет на здоровье населения. Причем в последнее время эта задача становится всё более актуальной, поскольку, во-первых, вследствие развития технологий производства пищевых продуктов, в последнее время они включают в себя всё большее количество функциональных добавок и посторонних веществ, имеющих различное происхождение и уровень токсичности для здоровья человека [3]. А во-вторых, в частности, одной из наиболее распространённых причин патологий сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта человека является даже не уровень токсичности потребляемых им продуктов питания, а просто их несбалансированность. При этом важно помнить, что сбалансированное питание, в современном его понимании, подразумевает не только соблюдение человеком норм потребления белков, жиров и углеводов, но и восполнение дефицита микроэлементов, витаминов и других биологически активных веществ, регулирующих различные метаболические процессы, протекающие в организме человека, а также нормальное развитие существующей с ним микробиоты и т.п.

В свою очередь, в силу многообразия и сложности состава продуктов питания всё труднее становится отслеживать уровни содержания в них микробных патогенов, тяжелых металлов, различных пищевых добавок, биотоксинов, остатков агрохимикатов и других потенциально опасных составляющих. Поэтому требуется разработка всё более эффективных инструментов для контроля качества и потенциальной токсичности, а также анализа свойств и состава различных пищевых продуктов [4–6].

Одним из способов решения этой задачи является использование мультисенсорных систем — в качестве которых в последнее время всё более активно применяются наборы как высоко-, так и низкоселективных химических сенсоров, обладающих перекрёстной чувствительностью к различным компонентам оцениваемых смесей, сигналы от которых обрабатываются с помощью различных математических методов («главных компонент», кластеризации данных, распознавания образов и т.п.) для выделения из исходных данных наиболее значимой и наглядной для дифференцировки анализируемых образцов информации.

Применимость одной из таких систем к оценке качества молочной продукции (которая, с одной стороны, до сих пор является одной из важнейших составляющих питания человека, а с другой стороны, представляет собой пример одной из широко распространённых биологических жидкостей, анализ которых весьма важен в современной диагностической медицинской практике) как раз и исследовалась в этой работе.

Упомянутая система состояла из одного хлорсеребряного электрода сравнения и двух измерительных электродов (мембранного, селективного на Fe^{3+} ионы, и низкоселективного железного «электрода 1-го рода»). С помощью этой системы были проведены прямые потенциометрические измерения ионного состава 12 образцов пастеризованного молока 3,2% жирности от разных производителей, имевших разные степени «свежести» и «разбавленности». Кроме того, была проведена оценка селективности использовавшихся измерительных электродов к разным видам ионов с помощью растворов, содержавших разные, заранее известные концентрации этих ионов.

В результате, на основании проведённых исследований была подтверждена селективность использовавшегося мембранного электрода к редокс потенциалу анализируемых растворов и присутствию в них Fe^{3+} , OH^- , Ag^+ и Hg^{2+} ионов; а также значительная степень перекрёстной чувствительности использовавшегося железного

«электрода 1-го рода» к редокс потенциалу анализируемых растворов и присутствию в них Al^{3+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} ионов (притом, что к присутствию Na^+ , K^+ и Zn^{2+} ионов этот электрод оказался практически нечувствителен, а к присутствию Ca^{2+} и Mg^{2+} ионов — малочувствителен).

Система же из двух вышеупомянутых измерительных электродов позволила достоверно дифференцировать анализируемые образцы молочной продукции как по степени их «свежести» (выражавшейся в «закисленности», вследствие жизнедеятельности молочнокислых бактерий), так и по степени «модельной сфальсифицированности» анализируемых образцов (вследствие разбавления их водой вместо обезжиренного молока).

Таким образом, проведенные исследования подтвердили, что даже простая трехэлектродная потенциометрическая система при правильном подборе составляющих ее электродов может быть использована для достаточно тонкого анализа состава таких сложных многокомпонентных смесей, какой является молоко (представляющее собой пример одной из широко распространённых биологических жидкостей, анализ которых весьма важен в современной диагностической медицинской практике; а кроме того являющееся одной из важных составляющих питания человека). В дальнейшем же мы собираемся развивать это направления, используя системы с существенно большим количеством взаимодополняющих сенсоров с последующей «интеллектуальной» математической обработкой получаемых от этих сенсоров сигналов с применением методов многомерного статистического анализа, «машинного обучения» и т.д.

Список литературы

1. Sibirtsev V.S., Ivanov S.D., Glibin E.N. Variation of spectral properties of actinocin derivatives due to equilibrium transformations. // Russian Journal of Organic Chemistry. 2000. V. 36. № 12. P. 1812–1818.
2. Sibirtsev V.S. Analysis of benzo[a]pyrene deactivation mechanisms in rats. // Biochemistry (Moscow). 2006. V. 71. № 1. P. 90–98.
3. Wishart D.S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. // Trends in food science & technology. 2008. V. 19. № 9. P. 482–493.
4. Sibirtsev V.S. Fluorescent DNA probes: study of mechanisms of changes in spectral properties and features of practical application. // Biochemistry (Moscow). 2007. V. 72. № 8. P. 887–900. <http://doi.org/10.1134/S0006297907080111>

5. Sibirtsev V.S., Naumov I.A., Kuprina E.E., Olekhovich R.O. Use of impedance biotesting to assess the actions of pharmaceutical compounds on the growth of microorganisms. // *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2016. V. 50. №. 7. P. 481–485. <http://doi.org/10.1007/s11094-016-1473-3>.

6. Sibirtsev V.S., Uspenskaya M.V., Garabadzhi A.V., Shvets V.I. Complex methods of instrumental microbiological testing of environmental safety of various products, wastes and territories // *Doklady Biological Sciences*. 2019. V. 485. № 6. P. 59–61. <https://doi.org/10.1134/S001249661902011X>

УДК 547.721/.729:547.279:547.786

Фандо Г.П.

*Белорусский государственный медицинский университет,
Минск, Республика Беларусь
gfando@mail.ru*

СИНТЕЗ СЕКОСТЕРОИДОВ ЭСТРАНОВОГО РЯДА

Исследованы методы синтеза 13,14-секо аналогов эстрогенов. Показано, что обработка гидрокситозилатов основанием приводит к промежуточному образованию аниона. Элиминирование тозилльной группировки протекает с разрывом C₁₃-C₁₄-связи и приводит к образованию секостероида. Протекание реакции зависит от конфигурации гидроксильной группы при C₁₄ и тозилльной группы при C₁₇. Синтезированные соединения являются сравнительно устойчивыми и могут быть использованы для поиска новых лекарственных препаратов.

Ключевые слова: *стероиды, секостероиды, гидроксילирование, гидрокситозилаты.*

Fando G.P.

*Belarusian State Medical University,
Minsk, Belarus
gfando@mail.ru*

SYNTHESIS OF ESTRANE SECOSTEROIDS

Methods for the synthesis of 13,14-seco androgen analogs have been investigated. It has been shown that the treatment of hydroxytosylates with a base leads to the intermediate formation of an anion. The elimination of the tosyl group leads to the breaking of the C₁₃-C₁₄ bond and the formation of a secosteroid. Reaction depends on the configuration of C₁₄ hydroxyl group and C₁₇ tosyl group at. The synthesized compounds are relatively stable and can be used to search for new drugs.

Keywords: *steroids, seco steroids, hydroxylation, hydroxytosylates.*

Разработка методов синтеза производных эстрана — одна из основных задач органической химии в последние десятилетия. Биологическая активность стероидных гормонов тесно связана с особенностями их химической структуры. Многие секостероиды, выделенные из растительного и животного сырья, являются биологически активными веществами. Они могут быть перспективны в медицине и сельском хозяйстве. Научный интерес, проявляемый к изучению методов синтеза производных эстрана, вызван тем, что биологическая активность может зависеть от наличия тетрациклического стероидного скелета [5].

Одним из направлений исследований по получению стероидов с необычным углеродным скелетом стали работы автора по синтезу 13,14-секостероидов [6]. Была исследована реакция радикального окисления 14 α -гидроксипроизводных, содержащих различные заместители при C₁₇. В качестве окислителей применяли тетраацетат свинца, оксид осмия (VIII) и церий аммоний нитрат [7].

Незначительное количество C₁₃-C₁₄-секостероидов были ранее выделены из растительного сырья. Выделенные из листьев однолетнего растения *Fysalis minima* физалины, обладают протовоспалительным действием, проявляют ингибиторную активность к росту некоторых раковых клеток человека [2]. Ранее исследовалась иммуномодулирующая и ингибиторная активность физалинов в образовании лимфоцитов и цитокининов при трансплантации. Использование фитостероидов при лечении различных иммунозависимых патологий целесообразнее из-за низкой токсичности. У выделенных из растительного сырья и синтезированных C₁₃-C₁₄-секопроизводных эстрана не была точно установлена конфигурация C₁₃. Кроме исследования методов синтеза секостероидов и проведения дальнейших химических преобразований, была поставлена задача установить стереохимию полученных соединений.

В качестве исходного соединения для синтеза 14 β -гидрокси-17 β -гозилата в настоящей работе использовался 3-метокси-7 α -метилэстра-1,3,5(10),15-тетраен-17-он 2 (рис. 1), который получили путем снятия диоксалановой группировки в ацетоне в присутствии водного раствора толуолсульфокислоты при комнатной температуре в течение 20 ч с высоким выходом. В ИК спектре кетона 2 появляются сигналы валентных колебаний карбонильной группы (1770 см⁻¹). 17 β -Гидрокси-3-метокси-7 α -метилэстра-1,3,5(10),14-тетраен 3, получен путем перегруппировки на силикагеле в присутствии триэтиламина с последующим восстановлением литий алюминогидридом.

Следующей задачей являлось превращение спирта 3 в эпоксид. Эпоксидирование, проведенное с помощью м-хлорнадбензойной кислоты, протекало с образованием двух изомеров 14 α ,15 α -эпоксида 5 и 14 β ,15 β -эпоксида 4 в соотношении 1:3. Доказательством правильности приписания конфигурации 14 β ,15 β -эпоксида 4, выделенного с выходом 58%, послужил рентгеноструктурный анализ специально синтезированного позже диацетата 12.

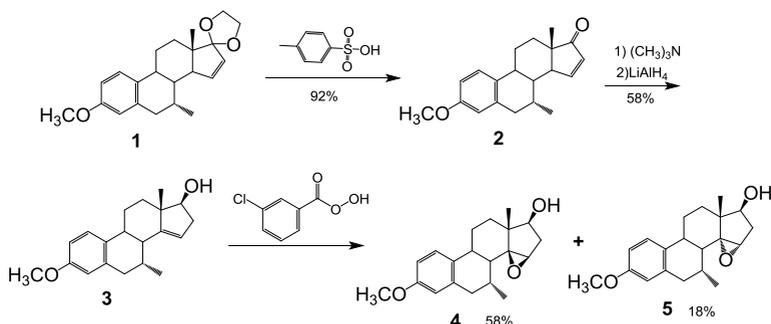


Рис. 1.

В масс-спектре 17 β -гидрокси-3-метокси-14 β ,15 β -эпокси-7 α -метилэстра-1,3,5(10)-триена 4 присутствует пик молекулярного иона соответствующий брутто формуле C₂₀H₂₇O₃ (m/z = 375). Восстановлении β -эпоксида 4 литий алюмогидридом с последующим тозилрованием привело к образованию соединения 6 (рис. 2). В спектре ПМР присутствует синглет с δ 2.45 м.д., принадлежащий протону при C17. Фрагментация 14 β -гидрокси-17 β -тозилата 6 протекала под действием сильного основания и привела с умеренным выходом (52%) к секостероиду 7. 3-Метокси-7 α -метил-13,14-секоэстра-1,3,5(10),13(17)E-тетраен-14-он синтезировали следующим образом: к смеси диметилсульфоксида (5 мл) и NaH (80%, 288 мг, 9,6 ммоль), выдержанной под аргоном при температуре 40° С в течение 1 ч, добавили раствор тозилата 6 (290 мг, 0.64 ммоль) в диметилсульфоксиде (3 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре 40° С в течение 1 ч. Затем разбавили насыщенным раствором NaCl и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушили над безводным сульфатом натрия и упарили в вакууме. Остаток нанесли на колонку с силикагелем и элюировали смесью петролейного эфира и этилацетата (10:1). Выделено 100 мг (52%)

3-метокси-7 α -метил-13,14-секоэстра-1,3,5(10),13(17)Е-тетраен-14-она 7. Т. пл. 103-105 $^{\circ}$ С (этанол). ИК (см $^{-1}$): 1710, 1620, 1510, 1465, 1325, 1245. 1 Н ЯМР δ : 0.95 (д, 3Н, J=7 Гц, 7-Ме), 1.87 (с, 3Н, 18-Ме), 3.78 (с, 3Н, ОМе), 5.44 (м, 1Н, C $_{17}$ -Н), 6.50-7.30 (м, 3Н, фенил). 13 С ЯМР δ : 16.8, 18.6, 21.6, 29.1, 34.6, 38.4, 39.6, 40.6, 41.8, 55.0, 59.8, 112.4, 112.9, 122.6, 129.4, 131.5, 137.8, 138.1, 156.9, 217.7. ВРМС содержит пик молекулярного иона с m/z=299.2010, соответствующий формуле C $_{20}$ H $_{27}$ O $_2$.

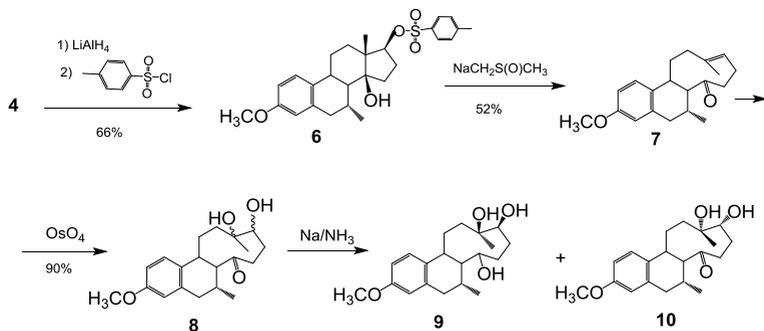


Рис. 2.

Далее были предприняты попытки стереоселективного гидроксирования енона 7 (рис. 2). В результате его окисления коммерческой смесью AD-mix- β , содержащей п-хлорбензоат дигидрохинидина была выделена смесь спиртов. Аналогичная картина наблюдалась при гидроксировании по Шарплесу AD-mix- α . Соотношение изомеров в обоих случаях было приблизительно одинаковым и не зависело от катализатора. Но полученные продукты оказались нестабильными. Диолы 8 удалось получить с выходом 90% после окисления эквимолярным количеством OsO₄. Попытки разделить изомеры оказалась неуспешными. Это удалось осуществить проведя реакцию восстановления по Сверну, в результате чего были выделены триолы 9 и 10. Далее с еноном 7 была осуществлена цепь химических превращений. Стереоселективное восстановление C₁₄-кетогруппы было осуществлено с помощью лития алюмогидрида с выходом 87%. В спектре ПМР появился дополнительный сигнал в виде мультиплета с δ 4.04 м.д., характерный для гидроксильной группы.

Объяснение стереоселективности последней реакции вытекает из молекулярной модели, согласно которой двойная связь в девятичленном цикле 11 ориентирована таким образом, что атака боргидридом возможна только с одной стороны молекулы.

Использование спектроскопии ядерного магнитного резонанса не позволяло сделать однозначный вывод о стереохимии углеродных атомов C₁₃, C₁₄, C₁₇. Рентгеноструктурный анализ стал методом решения данной проблемы. Для этого был специально синтезирован (13*R*,14*S*,17*S*)-14,17-диацетокси-3-метокси-7α-метил-13,14-секоэстра-1,3,5(10)-триен 12 (рис. 3). Рентгеноструктурный анализ данного соединения позволил однозначно приписать стереохимию C₁₃ после расщепления C₁₃ — C₁₄ связи.

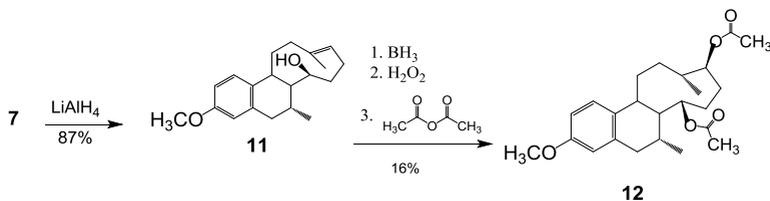


Рис. 3.

Вывод. Разработка методов получения 13,14-секостероидов представляет большой научный и практический интерес в плане обогащения арсенала синтетических методов в химии стероидов, а также для получения потенциально биоактивных соединений, которые в настоящее время недоступны для исследователей вследствие отсутствия методов их синтеза.

Список литературы

1. A Novel Cytotoxic Physalin from *Physalis angulata* / Jia-Jia Fana [et al.] // Nat. Prod. Commun. 2017, Vol.12. P. 1589-1591.
2. Physalin A, 13,14-Seco-16, 24-Cyclo-Steroid, Inhibits Stemness of Breast Cancer Cells by Regulation of Hedgehog Signaling Pathway and Yes-Associated Protein 1 (YAP1) / Yu-Chan Ko [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(16), 8718; <https://doi.org/10.3390/ijms22168718>.
3. Фандо Г.П. Биологическая активность секостероидов, выделенных из природных источников / Г.П. Фандо // Медицинский журнал. 2016. №1. С.69-72.

4. Antiproliferative and antimetastatic properties of 3-benzyloxy-16-hydroxymethylene-estradiol analogs against breast cancer cell lines / Izabella Sinka [et al.] // Eur. J. Pharm. Sci. 2018, 123. P. 362-370.

5. Structural analysis and antitumor potential of novel 5,6-disubstituted-17 α -homo-17-oxa-androstane derivatives / Ivana Kuzminac [et al.] // Struct. Chem. 2017, 28. P. 567-576.

6. Фандо Г.П. Современные подходы к синтезу секо-производных андростана // Вестник пермской государственной фармацевтической Академии. Научно-практический журнал. Научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященной 50-летию кафедры токсикологической химии. г. Пермь, 14-15 декабря 2022 г. С. 137-140.

7. Фандо Г.П. Подходы к синтезу 13,14-секо аналогов эстрогенов. Всероссийская научно-практической конференции с международным участием «Инновационные технологии в фармации», посвященной памяти доцента Пешковой В.А. Иркутск, 2019. С. 85-89.

УДК 541.49.183:546.562.'723:547.854.5

Шерстнев В.В.¹, Чухно А.С.², Сучкова К.М.³,

Тухватуллина Е.Р.⁴, Романенко М.С.⁵, Радин М.А.⁶

^{1,2,3,4,6}Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

^{2,5}ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург

¹friend-rus77@yandex.ru; ²alex-chuhno@yandex.ru;

³s.kseniya2002@yandex.ru; ⁴katheerinee_1@mail.ru;

⁵marina.romanenko.2001@mail.ru; ⁶radin.michail@pharminnotech.com

СИНТЕЗ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ АЛЬБУМИНОВЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ

Данная статья является продолжением наших предыдущих работ. В ней продемонстрирована возможность синтеза белкового пористого материала с помощью тепловой и индуцированной агрегации бычьего сывороточного альбумина, а также с использованием катализаторов полимеризации. Широкая доступность альбумина делает данный белок удобным объектом для синтеза на его основе бионосителей для различных лекарственных веществ, белков и др., а также его использование в качестве биосорбента.

Ключевые слова: гелеобразование белков, биodeградируемая матрица, субстрат для цитологических культур.

*Sherstnev V.V.¹, Chukhno A.S.², Suchkova K.M.³,
Tukhvatullina E.R.⁴, Romanenko M.S.⁵, Radin M.A.⁶
^{1,2,3,4,6}St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
St. Petersburg
^{2,5}North-Western State Medical University named
after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg*

SYNTHESIS AND POSSIBLE USE OF ALBUMIN HYDROGELS IN MEDICINE

This paper is a continuation of our previous papers. It demonstrates the possibility of synthesis of protein porous material using thermal and induced aggregation of bovine serum albumin, as well as using polymerization catalysts. The wide availability of albumin makes this protein a convenient object for the synthesis of biocarriers based on it for various drugs, proteins, etc., as well as its use as a biosorbent.

Keywords: *gelation of proteins, biodegradable matrix, substrate for cytological cultures.*

Введение. Разработка биосовместимых нетоксичных полимеров, обеспечивающих направленный, пролонгированный транспорт лекарственных веществ с их выделением непосредственно в очаге поражения, минуя желудочно-кишечный тракт и печень (где они могут частично инактивироваться и оказывают токсическое действие), остается актуальной задачей, не менее важной, чем разработка и синтез самого действующего лекарственного вещества.

Целью настоящего исследования является: синтез белково-пористой матрицы на основе бычьего сывороточного альбумина в подтверждение теоретических данных. А также изучить свойства полученных гидрогелей.

Задачами, решаемыми в ходе исследования, являются:

— Определить состав и соотношение компонентов реакционной смеси, необходимой для синтеза белково-пористой матрицы.

— Установить и описать специфику механизма образования белково-пористой матрицы на основе бычьего сывороточного альбумина устойчивую во внешней среде (рН среды, температура образования и время выдержки реакционной смеси в камере термостата; определить размеры белковых глобул).

– Описать строение и свойства новой белково-пористой матрицы — полученного образца геля БСА, полученного методом теплового и индуцированного гелеобразования, в том числе, полученного с использованием катализаторов полимеризации.

В процессе исследования было сделано предположение, что можно создать нетоксичный белковый полимер, если сначала развернуть все глобулы исходного белка (БСА), используя ацетилцистеин (АЦЦ); кроме того, прогреть полученную реакцию смесь на водяной бане, — это еще больше «развернет» глобулы БСА, а затем, добавить денатурирующий агент, либо **катализаторы полимеризации** (имидазол, дибазол, гистидин [1, 2]), и, продолжать нагревать реакцию смесь. Это сделает реакцию смесь более концентрированной вследствие выпаривания воды, и увеличит вязкость раствора. По мере продолжения нагревания денатурация БСА вызовет экспонирование слишком большого количества гидрофобных участков белка, а взаимодействия открытых гидрофобных участков, которые нестабильны в водной среде, приведет к агрегации белковых молекул с образованием геля.

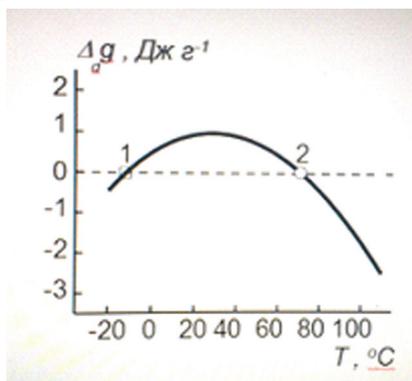


Рис. 1. Температурная зависимость свободной энергии денатурации БСА при pH 7,4 (20 мМ имидазольный буфер, 0,15 М NaCl): точка 1 — точка холодной денатурации ($T_1 = -12$ °C); точка 2 — точка тепловой денатурации ($T_2 = 71$ °C) [3].

На рисунке 1 [3,4] приводятся термодинамические параметры тепловой денатурации альбумина.

Согласно расчетам, выполненным д.х.н. В.Я. Гринбергом [3, 4], температурная зависимость свободной энергии денатурации белка лежит в широком интервале температур при pH=7.4. На представ-

ленной кривой с пиком в интервале максимальной стабильности альбумина, точка 1 (T1) — точка холодной денатурации (T1=-12 °С); точка 2 (T2) — точка тепловой денатурации (T2=71 °С).

Последующее помещение реакционной смеси в камеру термостата, или в криостат минимум на 24 часа, должно привести к усилению взаимодействия между отдельными частицами и, в результате, должен образоваться белковый гель: за счет сил когезии и за счет образования между молекулами БСА дисульфидных химических связей (-S-S-) за счет присутствия в реакционной смеси ацетилцистеина, обладающего сильными восстановительными свойствами.

Повышение концентрации ацетилцистеина и денатурирующих агентов в исходных водных растворах БСА, — в растворе при упаривании его на водяной бане, сам по себе тоже не приводит к формированию устойчивого во внешних условиях геля [5,6]. Таким образом, можно сделать вывод: что для формирования устойчивого геля необходимо совместное действие денатурирующего агента, восстановителя (ацетилцистеина), концентрирование раствора во время прогрева реакционной смеси на водяной бане, и, последующая экспозиция смеси в камере термостата, либо в криокамере не менее 24 часов либо использование катализатора полимеризации (имидазола, гистидина и др.).

Основная часть. Были использованы: бычий сывороточный альбумин (БСА), (BSA — Product number A2153, Fraction V, Sigma — Aldrich Company Ltd, Gillingham, UK). Растворы БСА 10 г/л получали медленным растворением лиофилизированного белка в дистиллированной воде.

Мочевина ($\geq 99.5\%$), ацетилцистеин ($\geq 99.5\%$), дистиллированная вода, водный раствор бензойной кислоты, водный раствор этанола, имидазол, дибазол, гистидин.

Применялись методы рН-метрии, кондуктометрии, световой микроскопии; термометрия с использованием хромель-копелевой термопары.

Известно, что средняя молярная масса нативного БСА при комнатной температуре составляет 6.6×10^4 г/моль, гидродинамический диаметр молекулы равен примерно 7 нм.

Расчеты: Чтобы рассчитать компоненты реакционной смеси следует исходить из состава молекулы БСА. Молярная концентрация БСА в его растворе с концентрацией 100 мг/мл составляет 1.44 ммоль/л, а общая концентрация остатков цистеина в нем составляет около 50.4 ммоль/л.

Таким образом, концентрация SS-связей составляет в нем 25.2 ммоль/л, а количество свободных SH-групп составляет примерно 1.44 ммоль/л, соответственно. Следовательно, для приготовления исходного раствора для синтеза гидрогеля БСА молярное соотношение свободных SH-групп и растворенного ацетилцистеина должно быть близко к эквимольному, но не более, иначе получится не гель, а более твердая структура [7].

Ацетилцистеин (N-ацетил-L-цистеин, NAC) — $C_5H_9NO_3S$, Молярная масса 163.19 г/моль. Для полного насыщения S-S связей свободных SH-групп в водном растворе БСА потребуется не более 1.44 ммоль ацетилцистеина, или $163.19 \cdot 0.0144 = 2.35$ г. В данном случае, было взято 1.2 г АЦЦ, то есть ацетилцистеин был взят в недостатке (50%).

Карбамид (мочевина) — $(NH_2)_2CO$ молярная масса 60.07 г/моль, необходим в качестве денатурирующего агента; карбамида брали 6 г, то есть 0.1 моль. Кроме того, карбамид, помимо денатурации, будет при гидролизе создавать в реакционной смеси среду с $pH=5.5$. Этот показатель близок к изоэлектрической точке БСА ($pH=4.7$) [8,9], что будет способствовать устойчивости геля во внешних условиях. Зная эти свойства, была использована именно эта концентрация, найденная опытным путем.

Этанол брали в количестве 100 мл 40% раствора.

Бензойную кислоту, — 1 г, растворенный в 100 мл воды.

Имидазол, дибазол, гистидин добавляли в раствор во время упаривания, в количестве 50 мг на 1,2 г исходного сухого БСА.

Методика проведения экспериментов. Навеску сухого АЦЦ, массой 1,2 г, растворяли в мерном стаканчике в 100 мл дистиллированной воды. Затем туда вносили навеску БСА массой 1,2 г, и перемешивали до полного растворения. Это было сделано потому, что лиофилизированный бычий сывороточный альбумин относится к белкам крови, является глобулярным белком, и, сам по себе, очень плохо растворяется в воде. Полученные растворы сливали в фарфоровую чашку прогревали и упаривали на водяной бане на 50% по объему.

К упаренному раствору добавляли денатурирующий агент (водный раствор мочевины, — содержащего 6 г карбамида в 20 мл дистиллированной воды; либо 1 г бензойной кислоты, растворенный в 100 мл дистиллированной воды; либо 100 мл 40% водного раствора этанола). Либо вместо денатурирующего агента использовали катализатор полимеризации — гистидин (50 мг).

Раствор перемешивали стеклянной палочкой и повторно упаривали на водяной бане до 10-15 мл. Приготовленную таким образом реакционную систему набирали в 20-миллилитровый пластиковый шприца, который герметизировали колпачком, и помещали в камеру жидкостного термостата (горячую воду), с температурой (от 80 до 90 оС), где выдерживали в течение 24 часов. В случае с использованием катализаторов полимеризации, — шприцы с реакционной системой оставляли при комнатной температуре.

После этого шприцы доставали, и, полученный гидрогель БСА извлекали из шприца. Полученный образец представлял собой вязкопластическую массу, устойчивую во внешних условиях, как показано на рис. 2.



Рис. 2. Образцы полученных гидрогелей

Результаты и их обсуждение. При изучении под световым микроскопом полученного образца было видно, что микроструктура полученного альбуминового геля (ув. 16×100) состоит из массы мелких шариков, между которыми имеется свободное пространство, то есть полученный гель имеет глобулярную пористую структуру.

Выводы. В результате проведенных исследований было установлено следующее:

Прогревание реакционной смеси на водяной бане с упариванием раствора способствует не только его концентрированию, но и дает начало процессу агрегации молекул белка.

Выявлено, что устойчивость белково-пористой матрицы на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА) достигается при $pH=5.5$ — слабокислом значении, близком к показателю изоэлектрической точки БСА, которое, в свою очередь, может достигаться в результате гидролиза мочевины, входящей в состав реакционной смеси [10].

Для формирования устойчивого геля бычьего сывороточного альбумина необходимо совместное действие денатурирующего агента (мочевины, или бензойной кислоты, или этанола), восстановителя (ацетилцистеина), концентрирование раствора во время прогрева, и, сам прогрев реакционной смеси на водяной бане, а также последующая обработка полученной смеси в камере термостата.

Температурные условия не влияют на процесс гелеобразования при введении в их состав имидазола или его производных [1-2,10].

В этом случае образование гелей при комнатной температуре происходит в течение первых 15-30 минут после заполнения шприцов. Таким образом, удалось значительно сократить время получения белково-пористых гелей.

Особенность опытов, проведенных с введением гистидина заключается в том, что гистидин, являясь природным производным имидазола, оказывает влияние на процесс гелеобразования, однако полученные на его основе гели абсолютно нетоксичны для человека (в отличие от гелей с введенным дибазолом и орнидазолом).

Полученный гель является устойчивым в достаточно широком диапазоне pH .

Создание таких материалов является актуальной и перспективной задачей на сегодняшний день.

Список литературы

1. Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Банкина А.Н., Бриллиантова Е.Ю. Изучение взаимодействия белков с биологически активными азотсодержащими гетероциклическими соединениями при различных значениях pH . Бутлеровские сообщения. 2013 Т. 34, №5. С. 91-99. ROJ: jbc-01/13-34-5-91.

2. 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.

3. Лозинский В.И. Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения —

полимерные криогели. Известия Академии Наук. Серия химическая. 2008 Т. 5. С. 996-1014.

4. Родионов И.А.: Криогели на основе сывороточного альбумина: синтез, свойства, структура и возможности биомедицинского применения. Дис. на соиск. уч. степени кандидата химических наук. Москва. 2017 156с.

5. Кременевская М.И., Шерстнев В.В., Чухно А.С., Романенко М.С., Тухватуллина Е.Р., Рудометова М.О., Сучкова К.М. Получение белково-пористых гидрогелей на основе на основе бычьего сывороточного альбумина на основе механизма тепловой и индуцированной агрегации белковых молекул. В сборнике: Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине. Сборник научных трудов 3-й Международной конференции, посвященной 110-летию доктора биологических наук, профессора А.П. Бресткина. Санкт-Петербург, 2022. С. 102-108.

6. Чухно А.С., Кременевская М.И., Шерстнев В.В., Дмитриева И.Б., Иванова И.С., Попов А.С., Романенко М.С., Жалко М.Е. Исследование специфики механизма образования белково-пористой матрицы на основе бычьего сывороточного альбумина. Бутлеровские сообщения. 2022. Т. 69. № 2. С. 127-136.

7. Лозинский В.И., Кулакова В.К., Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Ершов А.Г., Суханов Ю.В. Композиция для формирования макропористого носителя, используемого при трехмерном культивировании клеток животных или человека, и способ получения указанного носителя. Пат. РФ № 2594427 С1, 2015 28 С. Бюл. № 23 от 20.08.2016 г.

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. 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. 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.

УДК 544.08

*Широкова И.Ю., Кучук В.И., Радин М.А., Демина Е.В.,
Коленко Д.В., Малков С.Д., Зарифи К.О.
Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет,
Санкт-Петербург
irina.shirokova@pharminnotech.com*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ПОЛЯРИМЕТРИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ИБУПРОФЕНА

Проведен количественный анализ таблеток ибупрофена разных производителей с использованием метода спектрофотометрии. Исследована возможность использования метода поляриметрии для качественного и количественного анализа S-(+)-ибупрофена.

***Ключевые слова:** оптические изомеры, оптическая активность, ибупрофен, дексипрофен, спектрофотометрия, поляриметрия.*

*Shirokova I.Y., Kuchuk V.I., Radin M.A., Demina E.V.,
Koledenko D.V., Malkov S.D., Zarifi K.O.
St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
St. Petersburg*

USING SPECTROPHOTOMETRY AND POLARIMETRY METHOD FOR IBUPROFEN ANALYSIS

Quantitative analysis of ibuprofen tablets from different manufacturers using the spectrophotometry method was carried out. The possibility of using the polarimetry method for qualitative and quantitative analysis of S-(+)-ibuprofen is investigated.

***Keywords:** enantiomers, optical activity, ibuprofen, dexibuprofen, spectrophotometry, polarimetry.*

Ибупрофен — (2R,S)-1[4-(2-метилпропил)фенил] пропионо-
вая кислота — рацемическая смесь, состоящая из двух оптиче-
ских изомеров право- и левовращающихся— энантиомеров S-(+)
и R-(-) (рис. 1). Его довольно часто применяют в настоящее время
в качестве жаропонижающего, противовоспалительного и обезбо-
ливающего средства [1,2]. Ибупрофен в форме таблеток широко
представлен продукцией различных производителей. По мере со-
вершенствования технологии меняется как производство, так и ме-
тоды качественного и количественного анализа вещества в конеч-
ном продукте.

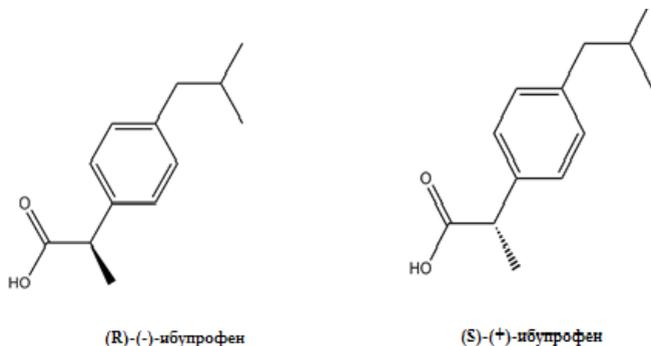


Рис. 1. Оптические изомеры ибупрофена

Задачами исследования являются определение содержания ибупрофена в таблетках разных производителей спектрофотометрическим методом, сравнение полученных данных с результатами поляриметрии для *S*-(+) изомера.

Объектами исследования являлись четыре образца: субстанция ибупрофена, таблетки двух производителей, содержащие ибупрофен (рацемат) и таблетки, содержащие дексипрофен (*S*-(+) изомер).

Образец №1. Субстанция ибупрофена, в соответствии с фармакопеей, характеризуется следующими свойствами: белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы, легко растворим в ацетоне, метаноле, метилхлориде, практически нерастворим в воде. В ультрафиолетовых спектрах поглощения 0,05% растворов субстанции и стандартного образца ибупрофена в 0,1 М растворе натрия гидроксида в области от 240 до 300 нм максимумы и плечо наблюдаются при одних и тех же длинах волн (соответственно, 264 ± 2 нм, 272 ± 2 нм и 258 ± 2 нм). Угол вращения от $-0,05$ до $+0,05$ ° (2,5% раствор субстанции в метаноле, ОФС «Поляриметрия») [3].

Определять содержание ибупрофена можно различными методами: титриметрический метод, ВЭЖХ и спектрофотометрия. Каждый из указанных методов имеет как свои преимущества, так и недостатки [4, 5]. Титриметрический метод заключается в титровании растворенного ибупрофена в спирте этиловом 95% раствором 0,1 М гидроксида натрия. Индикатором является фенолфталеин [6]. Этот метод определения является трудоемким, дорогостоящим.

Таблица 1. Объекты исследования

Показатель	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Образец № 4
Название	Субстанция ибупрофена	«Ибупрофен» Велфарм	«Зотек»	«Адвил»
МНН	Ибупрофен	Ибупрофен	Дексипрофен	Ибупрофен
Форма выпуска		таблетки, покрытые пленочной оболочкой	таблетки, покрытые пленочной оболочкой	таблетки, покрытые пленочной оболочкой
Содержание основного вещества		400 мг	300 мг	400 мг
Производитель		ООО «Велфарм»), г.Курган, проспект Конституции, д.11, Россия	Эвертоджен Лайф Саенсиз Лтд для «Органосин Лайф Саенсиз», Индия	Производитель: Вайет Ледерле С.п.А., Италия, Владелец РУ» Пфайзер Корпорэйшн Австрия ГмбХ», Австрия

Метод спектрофотометрии заключается в том, что готовят два раствора и снимают спектр поглощения при длине волны 259 или 269 нм и рассчитывают результаты по рабочему стандартному образцу (РСО) ибупрофена. Методика разработана авторами патента «Способ количественного определения ибупрофена» [7]. В патенте было показано, что для рацемата использование данного способа позволяет повысить воспроизводимость результатов определения, чувствительность анализа, уменьшить трудоемкость определения, исключить использование токсичных реактивов.

Несмотря на то, что метод спектрофотометрии пока не включен в фармакопею, его использование представляется перспективным. Для дальнейшего сравнения образцов таблеток ибупрофена и дексипрофена был выбран метод спектрофотометрии в ультрафиолетовом диапазоне длин волн.

Для измерения угла оптического вращения S-(+)-ибупрофена использовали сахариметр-поляриметр универсальный СУ-4. Прибор имеет диапазон измерений (при длине волны $\lambda=589,3$ нм) от -40 до +120 °S, порог чувствительности, °S, не более 0,05, пределы допускаемой основной погрешности $\pm 0,05^\circ\text{S}$.

Результаты и обсуждение. Методом спектрофотометрии были получены спектры поглощения образцов №1-4 в диапазоне длин волн 200-500 нм. Для всех образцов в 0,1 М растворе натрия гидроксида в области от 240 до 300 нм максимумы и плечо наблюдаются при одних и тех же длинах волн (соответственно, 264 ± 2 нм, 272 ± 2 нм и 258 ± 2 нм). Следовательно, качественный анализ показывает присутствие именно ибупрофена во всех образцах.

Количественный анализ проводили в соответствии с методикой расчета в патенте [1].

Полагают, что сначала измеряют оптическую плотность раствора феррицианида калия (далее соль) определенной концентрации, а затем приготовленного раствора. Исходят из условия, что стандартная концентрация соли (из навески 0,06г с последующим определенным разведением) и стандартная концентрация ибупрофена (из навески 0,05г с последующим определенным разведением) дают на 259 нм с раствором сравнения щелочи 0,1М одинаковую оптическую плотность. Поэтому соотношение для стандартов стремится к единице, а для произвольных растворов зависит от количества ибупрофена в «пробе» (точнее от массовой доли w , которую можно перевести в %).

Пользуются законом Бугера-Ламберта-Бера, не в молярных, а в удельных величинах, поэтому в формулу расчета вводят не привычный молярный коэффициент поглощения (ϵ), а удельный (E), после чего учитывают молярную и массовую концентрации:

$$D_0 = E_0 m_0 l; D_x = E_x m_x l,$$

где индекс «0» относится к феррицианиду калия, «x» к ибупрофену.

Тогда соотношение приобретает вид:

$$W = \frac{D_x E_0 m_0}{D_0 E_x m_x} = \frac{D_x K m_0}{D_0 m_x}$$

Далее необходимо связать массовую концентрацию с величиной навески (a_0 ; a_x) и разведением в каждом конкретном случае, а также отметить, что $K=E_0/E_x=2,279$.

Содержания ибупрофена в субстанции (образец №1) составило 99,9%, в таблетках (образцы №2-4) отклонение не превышало 5% считая на среднюю массу одной таблетки.

Таблица 2. Результаты измерения содержания ибупрофена в образцах 2–4

Показатель	Образец № 2	Образец № 3	Образец № 4
Масса ибупрофена в таблетке (теоретическая), мг	400,0	300,0	200,0
Масса ибупрофена в таблетке (экспериментальная), мг	398,2	313,7	208,4
X, %	1,8	4,6	4,2

В ходе исследования рацемата ибупрофена методом поляриметрии субстанции (образец №1), таблеток (образцы №№ 2,4) и S (+)-энантиомера ибупрофена, дексипрофена (образец №3) было установлено, что отклонение во всех случаях не превышает 5%.

В результате проведенных испытаний было обнаружено, что оптический угол субстанций ибупрофена (образец № 1), таблеток (образцы №№ 2, 4) равен или очень близок к нулю.

Таблица 3. Результаты исследования угла оптического вращения образцов

Образцы	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Образец № 4
α , град.	0	0	+3,5	0

Данные эксперимента подтверждают присутствие рацемата ибупрофена и отсутствие оптически активных веществ во вспомогательных веществах в образцах №№1,2,4. Угол оптического вращения образца №3 составил +3,5.

Таким образом, количественный анализ дексипрофена в таблетках можно проводить по методикам, разработанным для рацемата (ибупрофена). Результаты исследования угла оптического

вращения образцов показали его наличие только в образце №3, что связано с наличием S-(+)-ибупрофена, обладающего оптической активностью.

Список литературы

1. Ayres J.G. Ibuprofen. The American Society of Health-System Pharmacists / Ayres JG; Fleming D; Whittington R. / The Lancet : journal. Elsevier, 1987. 9 May (vol. 1, no. 8541). P. 1082. doi:10.1016/S0140-6736(87)90499-5. PMID 2883408.
2. Бушра Р. Обзор клинической фармакологии ибупрофена./ Бушра Р., Аслам — Н.: Oman Med J., 2010 — Jul; 25 (3): 155-1661. DOI: 10.5001 / omj.2010.49. [PubMed: 22043330].
3. Василенко И.А. Оптические изомеры в фармацевтике. / Василенко И.А., Лебедева М.В., Листров В.А. Разработка и регистрация лекарственных средств, 2015. №1 (10). С.92-104.
4. Артасюк Е.М. Способ определения ибупрофена / Артасюк Е.М., Илларионова Е.А., Сыроватский И.П. Медицинский вестник Башкортостана.-2006.-№ 1. С. 187-189.
5. Герасимчук Т.В. Спектрофотометрическое определение ибупрофена в таблеточной массе и таблетках, покрытых оболочкой. Научные труды, «Современные методы анализа фармацевтических препаратов», том XXVI. М., 1988. С. 39-42.
6. ФС 42-2823-92 «Ибупрофен». С. 3.
7. Патент RU2333490C2 Способ количественного определения ибупрофена. 01.09.2006.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ

УДК 577.15:616.31-006.04

Алаидини Л.Н., Брюханова Н.Д., Вольхина И.В.
Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург
liyaalmaz@icloud.com, asd9095zx@mail.ru

ЗНАЧЕНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-7 В РАЗВИТИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

Патогенное влияние металлопротеиназы-7 объясняется ее эффекторными функциями: влияние на Fas-лиганд, комплекс E-кадгерин/ β -катенин, коллаген IV типа. За счет своих специфичных действий данный фермент играет важную роль в развитии плоскоклеточного рака полости рта, его метастазировании в лимфоидную ткань, и поэтому может применяться в качестве биомаркера при данном заболевании.

Ключевые слова: *металлопротеиназа-7, плоскоклеточный рак ротовой полости, биомаркеры.*

Alaidini L.N., Brukhanova N.D., Volkhina I.V.
St. Petersburg State Pediatric Medical University,
St. Petersburg
liyaalmaz@icloud.com, asd9095zx@mail.ru

THE SIGNIFICANCE OF METALLOPROTEINASE-7 IN THE DEVELOPMENT OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

The pathogenic influence of metalloproteinase-7 is explained by its effector functions: action on Fas-ligand, E-cadherin/ β -catenin complex, and type IV collagen. Due to its specific actions, this enzyme plays an important role in the development of oral squamous cell cancer, its metastasis to lymphoid tissue, and therefore can be used as a biomarker for this disease.

Keywords: *metalloproteinase-7, oral squamous cell cancer, biomarkers.*

Плоскоклеточный рак ротовой полости (OSCC) является важной проблемой современного общества. Частота встречаемости этого заболевания очень высока: за 5-летний период число заболевших составило около миллиона людей. И поэтому актуальным вопросом является необходимость ранней постановки диагноза данного заболевания.

При развитии злокачественных опухолей в плазме крови появляются характерные биомаркеры, которые помогают установить природу рака. Среди них наибольшей популярностью обладают экзосомальные микроРНК, собственные раковые клетки, циркулирующие в плазме, и металлопротеиназы.

Наибольшую роль в метастазировании OSCC отдают металлопротеиназе-7, поскольку она характеризуется наименьшим размером среди металлопротеиназ и отражает наибольший инвазивный эффект опухолевых клеток.

Цель данного исследования является изучение особенности строения, синтеза, механизм действия и роль металлопротеиназы-7 в развитии и метастазировании плоскоклеточного рака ротовой полости.

Металлопротеиназы (ММР) относятся к цинкозависимым эндопептидазам, которые при их повышенном синтезе приводят к нарушению ремоделирования тканей.

В составе ММР выделяют 4 основных компонента: продомен, каталитический, шарнирный и гемопексиновый домены. Соединения гемопексинового и каталитического доменов осуществляется через шарнирный домен [1].

На основе субстратной специфичности ММР делятся на шесть групп [2].

1. Стандартные металлопротеиназы, разрушающие строму. Имеют обычную доменную структуру и состоят из продомена, каталитического центра, гемопексиновый домен и соединяющего последний с каталитическим доменом шарнирного домена. К этому классу относятся ММР-3, ММР-10, ММР-11, ММР мембранного типа 1.

2. Желатиназы: ММР-2, ММР-9.

3. Трансмембранные металлопротеиназы: ММР-14, ММР-15, ММР-16, ММР-24.

4. Металлопротеиназы с гликозилфосфатидилинозитоловыми связями: ММР-17, ММР-25.

5. Металлопротеиназы с трансмембранным белком типа II: MMP-23.

6. Металлопротеиназы с максимально упрощенной структурой, к которым относятся MMP-7, MMP-26. У этих MMP отсутствуют шарнирные и гемопексиновые домены.

Поскольку металлопротеиназы относятся к протеолитическим ферментам, то их основной функцией является деградация клеточных барьеров и инвазия патогенных клеток. В соответствии с вышеприведенной классификацией MMP выполняют ряд специфических функций: разрушают неколлагеновые белковые компоненты соединительной ткани, в том числе протеогликаны, фибронектин и ламинин [3]. MMP с желатиназной активностью гидролизуют желатин до полипептидов, пептидов и аминокислот, которые затем могут секретироваться через клеточную мембрану, класс матриксных протеиназ расщепляет эластин, коллаген II типа, фибронектин, витронектин, агрекан и протеогликан. Протеолиз белков базальной мембраны и межклеточного вещества параллельно с увеличением содержания VEGF содействуют развитию, неоваскуляризации и метастазированию опухолевой ткани [4].

MMP-7 (матрилизин-1) относится к семейству матриксных металлопротеиназ, при этом является самым маленьким по размеру представителем с молекулярной массой 28 кДа.

К особенности синтеза MMP-7 относится то, что его секреция осуществляется не только в опухолевых, но и в нормальных клетках, таких как макрофаги, эпителиальные клетки, миоциты. Матрилизин-1 синтезируется в виде неактивного профермента (про-матрилизина), который активируется путем удаления с N-конца продомена с молекулярной массой 9 кДа под действием трипсина, эндопептидаз, плазмина, а также путем связывания с соединениями ртути.

MMP-7 состоит только из двух доменов: пропептидного домена (pro) и каталитического домена (cat), что отличает его от прототипа MMP [5]. Домен пропептида состоит из трех α -цепей и соединительных петель. Каталитический домен содержит два иона цинка, два иона меди и шарообразную структуру, состоящую из трех α -спиралей, пяти β -листов и множества петель.

Экспрессия самой MMP-7 увеличивается за счет микробных ферментов, сериновых протеаз (к которым относятся трипсин, хитотрипсин, эластаза), миелопероксидазы. Также повышение синтеза MMP-7 происходит за счет увеличения экспрессии MMP-3.

ММП-7 может активировать неактивные формы других ММП (про-ММП-1, про-ММП-2, про-ММП-8 и про-ММП-9) и, таким образом, потенцирует протеолитические каскады. Роль ингибирования матриксных металлопротеиназ отдают семейству ТИМП (тканевый ингибитор металлопротеиназы). Особенно важно, что нормальных здоровых клетках концентрация, как ММП, так и ТИМП предельно низка [6].

В зависимости от строения клетки и ее патологического состояния существует два пути воздействия ММП-7 на Fas-лиганд, ведущих к апоптозу. В первом случае ММП-7 разрушает fas-лиганд, тем самым активирует Fas-ассоциированный домен смерти (FADD) и впоследствии каспазу-7, механизм действия которых уменьшает апоптоз, то есть защищает от гибели клеток на ранних стадиях развития. Во втором случае ММП-7, наоборот, активирует Fas-лиганд, находящийся в фибробластах и тем самым усиливает апоптоз клеток.

Е-кадгерин в комплексе с β -катенином образуют комплекс клеточной адгезии. При воздействии ММП-7 на Е-кадгерин, происходит его разрушение, что приводит к диссоциации комплекса Е-кадгерин/ β -катенин и образованию свободного β -катенина. Свободный β -катенин поступает внутрь клеток, где в комплексе с TCF/LEF (Т-клеточный фактор/лимфоидный энхансерный фактор) участвует в синтезе Мус — протоонкогена [7]. Такое явление приводит к нарушению клеточной адгезии, и в опухолевых клетках только усугубляет инвазию и метастазирование.

ММП-7 способна активировать ММП-2, разрушающую коллаген IV типа, что в ходе протеолитического каскада ведет к эпителиально-мезенхимальному переходу.

Плоскоклеточный рак ротовой полости характеризуется низкой выживаемостью, поскольку достаточно быстро прогрессирует, приводя к метастазированию в эндотелиальные стенки сердечно-сосудистой системы и лимфатические узлы, распространению опухолевых клеток за пределы базальной мембраны. Многие исследования показали, что экспрессия металлопротеиназ напрямую связана с развитием рака [4, 5].

Повышенная экспрессия ММП-7 часто отмечается в клинических образцах больных ОСС, что чаще всего указывает на инвазию и миграцию опухолевых клеток в лимфатические узлы. Также отмечалось, что ММП-7 ускоряет скорость метастазирования, однако это не доказано, поскольку повышенный перенос опухолевых кле-

ток выявлялся только в лимфатических узлах шеи, не затрагивая область живота и подколенного пространства.

Заключение: В развитии OSCC важное значение имеют матриксные металлопротеиназы, а именно MMP-7. Патогенное влияние MMP-7 объясняется ее эффекторными функциями: действие на Fas-лиганд, комплекс E-кадгерин/ β -катенин, коллаген IV типа. MMP-7, за счет своих специфичных функций, играет важную роль в развитии OSCC и его метастазировании в лимфоидную ткань, приводя к нарушению естественных защитных барьеров организма, поэтому MMP-7 может применяться в качестве биомаркера при OSCC.

Список литературы

1. Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling // *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2007. №8(3). С. 221-233.
2. Michalczyk, K., & Cymbaluk-Płowska, A. Metalloproteinases in Endometrial Cancer-Are They Worth Measuring? // *International journal of molecular sciences*. 2021. №22(22). С. 12472.
3. Raeeszadeh-Sarmazdeh M., Do L.D., Hritz B.G. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics // *Cells*. 2020. №9(5). С. 1313.
4. Герштейн Е.С., Огнерубов Н.А., Кушлинский Н.Е. Ассоциированные с опухолью протеазы и их тканевые ингибиторы. В книге: под ред. Кушлинского Н.Е., Красильникова М.А. Биологические маркеры опухолей: фундаментальные и клинические исследования. М.: Издательство РАМН. 2017. с. 197–230.
5. Liu Z., Tan R.J., Liu Y. The Many Faces of Matrix Metalloproteinase-7 in Kidney Diseases // *Biomolecules*. 2020. №10(6). С. 960.
6. Alfakry H., Malle E., Koyani C.N., Pussinen P.J., Sorsa T. Neutrophil proteolytic activation cascades: a possible mechanistic link between chronic periodontitis and coronary heart disease. // *Innate Immunity*. 2016. №22(1). С. 85-99.
7. Cadigan K.M., Waterman M.L. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. // *Cold Spring Harb Perspect Biology*. 2012. №4(11). С. a007906.

УДК 616.61-008.6

*Александрова Л.А., Рейпольская Т.Ю.,
Субботина Т.Ф., Жлоба А.А.
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России,
Санкт-Петербург
Laa2004@mail.ru, 23091991tink@mail.ru,
subbotina2002@mail.ru, zhlobaaa@lspbgnu.ru*

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАТИОНА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК НА РАННИХ СТАДИЯХ В СОЧЕТАНИИ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Установлены нарушения, выражающиеся в снижении активности глутатионредуктазы и уровня глутатиона восстановленного в эритроцитах, наиболее значительные на 2 стадии хронической болезни почек, что коррелировало с показателями почечной фильтрации СКФ и концентрацией креатинина в плазме крови. Наличие гипертонической болезни существенно не сказывалось на исследованных показателях.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, гипертоническая болезнь, глутатион, глутатионредуктаза.

*Aleksandrova L.A., Reypol'skaya T. Yu.,
Subbotina T.F., Zhloba A.A.
Pavlov First St. Petersburg State Medical University,
St. Petersburg*

FEATURES OF ERYTHROCYTE GLUTATHIONE METABOLISM IN CHRONIC KIDNEY DISEASE IN THE EARLY STAGES IN COMBINATION WITH HYPERTENSION

Metabolic disorders were established, expressed in a decrease in the activity of glutathione reductase and the level of glutathione reduced in erythrocytes, the most significant at stage 2 of chronic kidney disease, which correlated with the indicators of renal filtration of GFR and the concentration of creatinine in the blood plasma. The presence of hypertension did not significantly affect the studied parameters.

Keywords: chronic kidney disease, hypertension, glutathione, glutathione reductase.

Хроническая болезнь почек (ХБП) и гипертоническая болезнь (ГБ) объединены тесными причинно-следственными связями. Патфизиологические механизмы обоих заболеваний включают воспаление, оксидативный стресс (ОС), эндотелиальную дисфункцию

(ЭД), нарушение клеточного окислительно-восстановительного (Ред/Окс) потенциала [1]. Пациенты с сочетанием ХБП и ГБ имеют высокий риск сердечно-сосудистых заболеваний и смертности. Развитие ЭД, и ОС могут являться, как причиной, так и следствием этих заболеваний [2]. Одним из звеньев обеих патологий рассматривается нарушение баланса клеточного Ред/Окс потенциала глутатиона [3].

В поддержании пула ГлВ в клетке и клеточного Ред/Окс потенциала служит фермент глутатионредуктаза (ГР), основная регуляторная функция которой состоит в переводе окисленного глутатиона (GSSG) в его восстановленную форму (GSH). Оптимальное соотношение GSH/GSSG является существенным для жизнеспособности клетки. По данным литературы [4] и результатам наших исследований [5] на поздних стадиях ХБП в эритроцитах периферической крови больных наблюдается низкий уровень ГлВ и активности ГР. Состояние этих показателей на ранних стадиях ХБП и взаимосвязь с почечной функцией остаются не выясненными.

Цель работы: состояла в изучении уровня ГлВ и активности ГР эритроцитов и взаимосвязи с показателями почечной функции у больных на ранних стадиях ХБП с различными формами ГБ.

Материал и методы. В исследовании участвовали 87 пациентов с ХБП, из них 22 человека имели диагноз первичной и 38 — с вторичной ГБ, а у 27 человек ГБ не диагностирована. Для изучения параметров метаболизма глутатиона в эритроцитах по степени тяжести заболевания основная группа была разделена на подгруппы согласно общепринятой классификации стадий ХБП. Группу сравнения составили образцы крови от 41 (22 мужчины и 19 женщин) доноров в возрасте 46 (25–58) лет без ГБ и без признаков хронических заболеваний в анамнезе. Имелось информированное согласие обследуемых на анонимное использование полученных данных. В 10% гемолизатах проводили определение ферментативной активности ГР и концентрации ГлВ [6], которые рассчитывали на грамм гемоглобина. Окислительно-восстановительный потенциал эритроцитов оценивали по уровню ГлВ и активности ГР.

Статистический анализ проводили с помощью программы «SPSS 21 for Windows». Результаты представляли в виде медианы и межквартильного размаха $M(Q_1-Q_3)$. Для проверки гипотезы о различии выборок использовали непараметрические критерии Манна–Уитни (в случае двух независимых выборок) и критерий Краскела–Уоллеса (для нескольких независимых выборок с поправкой Бонферрони

при попарном сравнении). Для оценки корреляционных связей использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты и их обсуждение. Как следует из табл. 1, в основной группе больных ХБП активность ГР и уровень ГЛВ были статистически значимо ниже референтных значений этих показателей по медиане на 45% и 20%, соответственно. У пациентов с 1-й стадией ХБП наблюдалось статистически значимое снижение активности ГР более чем на 80% по сравнению с референтной группой, тогда как концентрация ГЛВ оставалась в пределах значений группы сравнения. В выборке пациентов со 2-й стадией ХБП низкая активность ГР определялась на уровне группы в целом, а уровень ГЛВ был ниже референтных значений на 20%.

Таблица 1. Показатели метаболизма глутатиона у больных ХБП основной группы, 1-й, 2-й стадии ХБП и референтной группы

Показатель	Основная группа n=87	Стадия ХБП 1 n=36	Стадия ХБП 2 n=51	Референтная группа n=41	p-значение
ГР, Ед/г Hb	0,98 (0,62- 0,37)	0,78 (0,56- 1,18)	0,97 (0,62- 1,36)	1,43 (1,19-2,1)	P1=0,001 P2=0,001 P3=0,002
ГЛВ, мкМ/г Hb	3,08 (2,22- 3,98)	3,62 (2,82- 5,21)	2,97 (2,08- 3,90)	3,7 (3,3-4,8)	P1=0,002 P3=0,030

Активность ГР коррелировала с показателем СКФ ($R = -0,201$), а также с концентрацией креатинина ($R=0,225$; $p=0,030$) и концентрацией мочевины ($R=0,226$; $p=0,022$) в плазме крови. Уровень ГЛВ в эритроцитах отрицательно коррелировал с концентрацией креатинина ($R = -0,245$; $p=0,012$) и положительно с показателем СКФ ($R=0,225$; $p=0,023$), что свидетельствует о связи этого метаболита с нарушением почечной фильтрации.

Анализ основной выборки, разделенной по признаку наличия ГБ, позволил выявить статистически значимые различия активности ГР (рис. 1) с их референтными значениями, у пациентов с ХБП как на 1-й, так и на 2-й стадиях независимо от наличия у них ГБ.

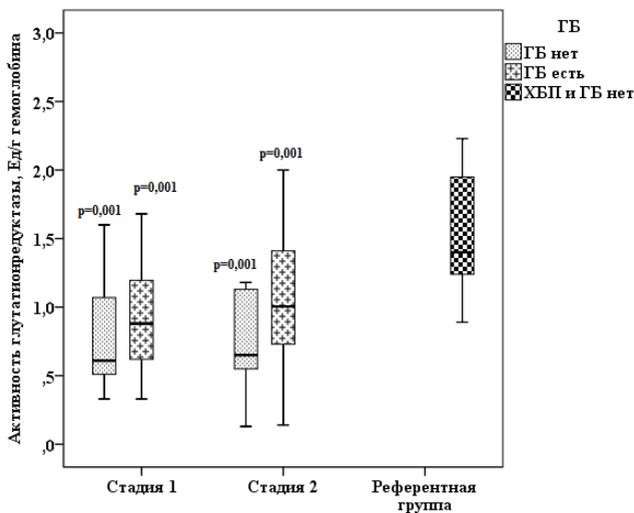


Рис. 1. Активность глутатионредуктазы эритроцитов доноров референтной группы и больных ХБП 1-й и 2-й стадий в сочетании с ГБ

Уровень ГлВ (рис. 2) был ниже референтных значений только в подгруппе больных ГБ и ХБП 2-й стадии. Сравнение показателей метаболизма глутатиона между подгруппами пациентов с первичной и вторичной ГБ не выявило различий на обеих стадиях ХБП.

Механизм регуляции метаболических процессов в клетке включает тиол-зависимый окислительно-восстановительный цикл, основанный на способности тиольных групп обратимо изменять свое редокс-состояние посредством влияния на конформационное состояние и каталитические свойства белков. Соотношение GSH/GSSG составляет основу для поддержания с помощью тиольных групп клеточного Ред/Окс потенциала. Снижение концентрации GSH ниже физиологического уровня приводит к нарушению окислительно-восстановительных процессов в организме, что наблюдается при многих патологических состояниях [7].

Как следует из полученных нами данных, уже на начальных стадиях ХБП у больных обнаруживается низкий уровень ГлВ в сочетании с недостаточностью активности ГР в эритроцитах. Эти нарушения коррелируют с изменениями основных показателей почечной фильтрации: СКФ, суточной протеинурией, концентрацией креатинина в плазме крови.

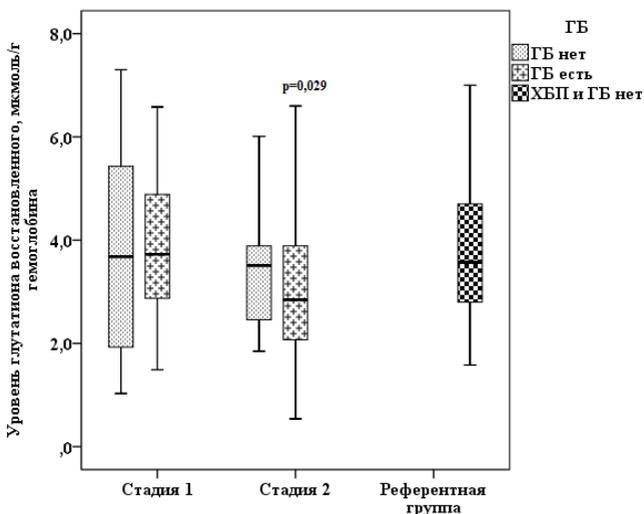


Рис. 2. Уровень глутатиона восстановленного в эритроцитах доноров референтной группы и больных ХБП 1-й и 2-й стадий в сочетании с ГБ

Ключевое значение для поддержания пула ГлВ для регуляции окислительно-восстановительного потенциала клетки имеет ГР, которая эффективно переводит глутатион из окисленной формы в восстановленную, тем самым обеспечивая глутатион-зависимые ферменты необходимым субстратом для осуществления множества защитных и сигнальных функций. Известно, что активность ГР в клетке регулируется посредством изменения соотношения GSH/GSSG в определенных пределах [8].

Отсутствие различий в исследуемых нами показателях между пациентами с наличием и отсутствием ГБ, как первичного, так и вторичного генеза может объясняться общими нарушениями этого метаболического звена при обеих патологиях, которые происходят уже на ранней стадии ХБП. Нарушения метаболизма глутатиона ранее выявленные нами у пациентов с ГБ и системными аутоиммунными заболеваниями [9] сходны с данными, полученными в настоящем исследовании, что возможно, объясняется общей проблемой ЭД и ОС [10].

По мнению ряда исследователей, показатели метаболизма глутатиона, в частности, снижение Ред/Окс-потенциала эритроцитов могут служить прогностическим критерием ХБП [3, 4]. Хотя для использования в качестве прогностического критерия показателей активности ГР, уровня ГлВ при ХБП в сочетании с ГБ недостаточно

убедительных данных, можно ожидать, что нормализация этих показателей приведет к снижению риска развития ХБП и ГБ.

Заключение. Уже на начальных стадиях ХБП установлены метаболические нарушения, выражающиеся в снижении активности ГР и уровня ГлВ в эритроцитах, наиболее значительные на 2 стадии, что коррелировало с показателями почечной функции. Наличие ГБ на ранних стадиях ХБП существенно не сказывалось на активности ГР и уровне ГлВ в эритроцитах.

Список литературы

1. De Bhailis Á.M., Kalra P.A. Hypertension and the kidneys // *Br J Hosp Med (Lond)* 2022;83(5):1-11. doi: 10.12968/hmed.2021.0440. Epub 2022 May 27. PMID: 35653320.
2. Vallianou N.G., Mitesh S., Gkogkou A., Geladari E. Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Is there Any Relationship? // *Curr Cardiol Rev* 2019;15(1):55-63. doi: 10.2174/1573403X14666180711124825. PMID: 29992892; PMCID: PMC6367692.]
3. Go YM, Jones DP. Thiol/disulfide redox states in signaling and sensing // *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013;48(2):173-81. doi: 10.3109/10409238.2013.764840. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23356510; PMCID: PMC4323379]
4. Yeh E.L., Chen C.H., Huang S.C. et al. Higher glutathione demand may be necessary for assisting haemodialysis patients to cope with increased oxidative stress // *Nephrology*. 2020;25(1):90-95. doi: 10.1111/nep.13588.
5. Александрова ЛА, Субботина ТФ, Жлоба АА. Состояние гомеостаза глутатиона при гипертонической болезни в сочетании с хронической болезнью почек // Сб. тезисов Всероссийского терапевтического конгресса с международным участием «Боткинские чтения», 2023, СПб., 13-14.
6. Александрова Л.А., Миронова Ж.А., Филиппова Н.А., Трофимов В.А. Состояние системы глутатиона в эритроцитах у пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией // *РКМ* 2015;14(4):60–65. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2015-14-4-60-65>
7. Giustarini D, Dalle-Donne I, Milzani A et al. Membrane skeletal protein S-glutathionylation in human red blood cells as index of oxidative stress // *Chem Res Toxicol*. 2019;32:1096–1102. doi: 10.1080/13813450701661198
8. Jobbagy S., Vitturi D.A., Salvatore S.R. et al. Electrophiles modulate glutathione reductase activity via alkylation and upregulation of glu-

tathione biosynthesis // Redox Biol. 2019;21:101050. doi: 10.1016/j.redox.2018.11.008. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30654300

9. Александрова Л.А., Субботина Т.Ф., Жлоба А.А. Взаимосвязь дефицита фолатов, гипергомоцистеинемии и метаболизма глутатиона у больных артериальной гипертензией // Артериальная гипертензия. 2020;26(6):656–664. doi:10.18705/1607-419X-2020-26

10. Malyszko J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease // Clin Chim Acta. 2010;411(19):1412-1420. doi: 10.1016/j.cca.2010.06.019

УДК 577.15

Вохмянина Н.В., Соколова М.Н., Зверева А.Р., Харина А.Ю.
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург
Natalya.Vokhmyanina@szgmu.ru

СЕЛЕН И АУТОИММУННЫЙ ТИРЕОДИТ

В статье представлены результаты исследования по изучению влияния селена на функцию щитовидной железы при аутоиммунном тиреоидите в фазу эутиреоза и субклинического гипотиреоза, которые подтвердили необходимость включения селена в качестве дополнения к медикаментозной терапии.

Ключевые слова: *селен, аутоиммунный тиреоидит, субклинический гипотиреоз, эутиреоз.*

Vokhmyanina N.V., Sokolova M.N., Zvereva A.R., Kharina A.U.
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg

SELENIUM AND AUTOIMMUNE THYROIDITIS

The article presents the results of a study examining the effect of selenium on thyroid function in autoimmune thyroiditis in the phase of euthyroidism and subclinical hypothyroidism, which confirmed the need to include selenium as an adjunct to drug therapy.

Keywords: *selenium, autoimmune thyroiditis, subclinical hypothyroidism, euthyroidism.*

Обоснование. Селен (Se) относится к числу незаменимых микроэлементов, который непосредственно участвует в основных жизненно важных клеточных процессах: окислительное фосфорилирование (дыхательная цепь переноса электронов), пентозофосфатный цикл и цикл трикарбоновых кислот, антиоксидантная система, перекисное

окисление липидов (ПОЛ), регуляция клеточного роста, апоптоз, иммунные процессы организма человека. Достоверно изучено, что недостаток селена повышает вероятность развития атеросклеротических процессов, сердечно-сосудистых заболеваний и инсультов, катаракты и многих форм рака, приводит к бесплодию у мужчин и задержке роста у детей [1].

По содержанию селена (Se) на грамм ткани щитовидная железа занимает первое место среди всех органов человека и отмечена важность участия и особая роль селена в работе щитовидной железы. Некоторые клинические исследования показали, что такое высокое содержание селена необходимо для выработки гормонов щитовидной железы и правильной работы этого органа, подтвердив, что недостаток селена способствует увеличению распространенности заболеваний щитовидной железы, в том числе аутоиммунного тиреоидита [2]. Аутоиммунный тиреоидит (АИТ), известный как хронический лимфоцитарный тиреоидит, представляет собой аутоиммунное заболевание, характеризующееся инвазией аутореактивных лимфоцитов в щитовидную железу, вызывающей формирование гипотиреоза и являясь наиболее частой причиной его появления. Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) встречается примерно у 0,3–1,5 на 1000 человек, с более высокой распространенностью у женщин среднего возраста, чем у мужчин, со средней частотой встречаемости до 5% населения мира [3].

В последние годы отмечены латентный характер аутоиммунного тиреоидита и атипичность клинической симптоматики, что приводит к задержке постановки правильного диагноза и формированию хронических форм как самой частой причиной развития гипотиреоза.

Представленные в печати многочисленные результаты проводимых исследований по влиянию дефицита селена на развитие аутоиммунного тиреоидита остаются до сих пор противоречивыми и не дают однозначного ответа.

Цель. Провести обследование больных с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) на антитела к тиреопероксидазе (АТ-ТПО), свободный трийодтиронин (св.Т3), свободный тироксин (св.Т4) и тиреотропный гормон (ТТГ). Выполнить анализ полученных результатов для изучения влияния селена на повреждение тиреоцитов и снижение их функциональной активности. Определить целесообразность включения селена в лечение аутоиммунного тиреоидита.

Материал и методы. В исследование были включены женщины в возрасте от 20 до 50 лет, средний возраст которых составил 35 ± 15 лет.

Пациентки (всего 60 человек) были рандомизированы в две группы по 30 человек каждая в зависимости от выраженности и длительности дефицита тиреоидных гормонов: 36 пациенток — АИТ в фазе эутиреоза и 24 пациенток с субклиническим гипотиреозом, у которых АТ-ТПО превышали 100 мЕд/л.

В первой группе (18 пациенток — АИТ в фазе эутиреоза и 12 пациенток с субклиническим гипотиреозом) использовалось плацебо.

Во второй группе (18 пациенток — АИТ в фазе эутиреоза и 12 пациенток с субклиническим гипотиреозом) проводился прием селена (Se, 200 мкг) вместо плацебо.

Исходно до начала наблюдения, оценивались показатели: ТТГ, св.Т4, св.Т3, АТ-ТПО. Также проводилось УЗИ щитовидной железы, с оценкой объема и эхогенности паренхимы ЩЖ. Период наблюдения составил 3 месяца, по завершении которого повторно была проведена оценка тех же лабораторных показателей.

Критерии соответствия. В исследование включались женщины в возрасте от 20 до 50 лет с одинаковой продолжительностью заболевания, находящиеся на лечении L-левотироксина.

Для группы с эутиреозом учитывались результаты с уровнем АТ-ТПО >100 мЕд/л (референтный предел 0–60 мЕд/л), при референтных значениях ТТГ (0,4–4,0 мЕд/л), Т4 (11,5–23,2 пмоль/л) и Т3 (3,5–6,5 пмоль/л).

Для группы с субклиническим гипотиреозом использовались результаты АТ-ТПО >100 мЕд/л, при повышенном уровне ТТГ 4,0–10,0 мЕд/л (0,4–4,0 мЕд/л) и референтных значениях Т4 (11,5–23,2 пмоль/л) и Т3 (3,5–6,5 пмоль/л).

Из исследования были исключены беременные, кормящие грудью, пациентки, имеющие тяжелую полиорганную патологию, инфекционные и психологические заболевания.

Статистический анализ. Использовался статистический пакет программ SPSS 17.0. Количественные непрерывные показатели проверялись на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, а также по величине асимметрии и эксцесса. Качественные, дискретные количественные и количественные непрерывные при ненормальном распределении величины оценивались методами непараметрической статистики: критерии Манна–Уитни, Пирсона (χ^2 , хи-квадрат). Результат или разница значений считалась достоверной при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты. Исходно и на протяжении всего периода наблюдения (3 месяца) в первой группе пациенток (плацебо) не наблюда-

лось значимых отличий ($p > 0,05$) по показателям ТТГ, св.Т3, св.Т4 и по данным УЗИ (объем, экзогенность паренхимы ЩЖ). Достоверно значимые отличия в этой группе отмечались между пациентами с эутиреозом и субклиническим гипотиреозом в показателях АТ-ТПО, которые в группе с эутиреозом были статистически значительно ниже ($p < 0,05$), чем в группе с субклинической формой гипотиреоза (табл. 1).

Что касается второй группы (селен), то на протяжении всего периода наблюдения (3 месяца) не выявлено статистически значимых отличий динамики показателей ТТГ, но отмечено достоверное снижение св.Т3 и выравнивание уровня св.Т4. Также установлено достоверно значимое ($p < 0,05$) значительное понижение АТ-ТПО (табл. 3) и изменение данных УЗИ (табл. 2).

Таблица 1. Лабораторные показатели у пациенток первой группы

Параметр	Первая группа (плацебо) АИТ в фазе эутиреоза						p
	Исходные лабораторные показатели			Лабораторные показатели через 3 месяца			
	Медиана	Q25	Q75	Медиана	Q25	Q75	
ТТГ	2,41	1,80	3,60	2,32	1,60	3,40	0,622
Т3	4,85	4,40	4,90	4,74	4,30	4,80	0,257
Т4	18,24	17,04	19,50	17,73	16,20	18,30	0,452
АТ-ТПО	253,88	217,00	316,50	244,90	208,30	307,50	0,021
	Первая группа (плацебо) субклинический гипотиреоз						p
	Исходные лабораторные показатели			Лабораторные показатели через 3 мес			
	Медиана	Q25	Q75	Медиана	Q25	Q75	
ТТГ	7,65	7,10	8,30	7,59	7,24	8,24	0,423
Т3	3,88	3,65	4,40	3,86	3,55	4,25	0,099
Т4	12,22	11,50	13,70	11,98	11,60	12,10	0,632
АТ-ТПО	807,20	505,0	1510,5	732,3	416,0	1421,0	0,036

Таблица 2. Показатели экзогенности паренхимы щитовидной железы

Параметр		Первая группа (плацебо)		Вторая группа (Se)		χ^2 (критерий Пирсона)
		п	%	п	%	
Эхогенность исходная	Сниженная	19	63,3	20	66,6	0,51
	Смешанная	4	13,4	2	6,7	
	средняя	7	23,3	8	26,7	
Эхогенность (через 3 мес)	Сниженная	19	63,3	22	73,3	0,82
	Смешанная	4	13,4	1	3,4	
	средняя	7	23,3	7	23,3	

Таблица 3. Лабораторные показатели у пациенток второй группы

Параметр	Вторая группа (Se, 200 мкг) АИТ в фазе эутиреоза						p
	исходные лабораторные показатели			лабораторные показатели через 3 месяца			
	Медиана	Q25	Q75	Медиана	Q25	Q75	
ТТГ.	2,89	2,75	3,07	2,83	2,70	3,01	0,565
Т3	4,99	4,85	5,50	4,39	4,11	4,65	0,035
Т4.	15,61	14,66	16,30	14,15	12,95	15,40	0,025
АТ-ТПО	162,40	162,80	163,0	107,60	143,50	170,00	0,012
	Первая группа (Se, 200 мкг) субклинический гипотиреоз						P
	Исходные лабораторные показатели			Лабораторные показатели через 3 мес			
	Медиана	Q25	Q75	Медиана	Q25	Q75	
ТТГ	8,67	7,69	9,32	8,51	7,53	9,16	0,315
Т3	4,09	4,00	4,25	3,72	3,50	4,20	0,046
Т4	13,06	11,70	14,20	12,13	10,75	13,40	0,042
АТ-ТПО	837,20	535,2	1540,00	462,40	294,50	943,00	0,023

Обсуждение. Известно, что селен в щитовидной железе представлен в виде селенопротеинов, содержащих один или несколько остатков аминокислоты селеноцистеина (Se-Cys). Селен-цистеин-содержащие протеины экспрессированы в щитовидной железе и представлены в основном в тироцитах глутатионпероксидазами (cGPx, рGPx, PH-GPx), 5-дейодиназами 1-го типа, селенопротеином Р [4]. Главным образом на тиреоидный статус действуют селенсодержащие дейодиназы, которые переводят неактивную форму тиреоидных гормонов (Т4) в активную (Т3). Кроме этого, они способны переводить Т4 в неактивную форму гормона — реверсивный Т3. В процессе синтеза тиреоидных гормонов в тироцитах накапливается перекись водорода (H_2O_2), являющаяся мощным оксидантом. Функция глутатионпероксидазы включает инактивацию перекиси водорода и свободных радикалов, тем самым ограничивая их повреждающее действие на ткань щитовидной железы. Дефицит селена нарушает функции глутатионпероксидазы и приводит к изменению паренхимы щитовидной железы, что отражается на показателях эхогенности паренхимы щитовидной железы [5]. Подтверждение этого эффекта получено в собственных результатах, представленных в табл. 2. При дефиците селена также формируется недостаток дейодиназ различных типов, снижается образование Т3, приводящее к стимуляции гипоталамо-гипофизарной оси по системе отрицательной обратной связи и увеличению синтеза тиреотропного гормона (ТТГ). ТТГ стимулирует продукцию тиреоидных гормонов и повышает активность дейодиназ, восстанавливая уровень тиреоидных гормонов. Но при этом он стимулирует образование перекиси водорода, для инактивации которой опять же требуется глутатионпероксидаза, активность которой в условиях дефицита селена снижена. Перекись водорода накапливается в щитовидной железе, что приводит к повреждению тироцитов и развитию фиброза [6]. Повышенное образование перекиси водорода в тироците наблюдается во всех случаях избыточной стимуляции щитовидной железы со стороны ТТГ, например, у больных с аутоиммунным тиреоидитом и субклиническим гипотиреозом. В такой ситуации селенопротеины, обладая антиоксидантной активностью, могут предотвратить или хотя бы затормозить процесс разрушения тироцитов и снижения их функциональной активности [7]. Селен может регулировать уровень антител щитовидной железы у пациентов с АИТ и участвует в биосинтезе гормонов щитовидной железы в организме. В последние годы многие исследования показали, что

добавки селена полезны для регулирования уровней тиреотропного гормона (ТТГ), трийодтиронина (св.Т3), тироксина (св.Т4), АТ-ТПО в сыворотке крови, а они, в свою очередь, оказывают иммуномодулирующий эффект, что подтверждается результатами нашего исследования (см. таб.3).

Аутоиммунный процесс АИТ сопровождается специфическим повышением уровня антител к тироидной пероксидазе (АТ-ТПО). Такое конкретное повышение предполагает, что нарушения гуморального иммунитета могут быть одним из факторов риска, связанных с АИТ. Проведенное исследование продемонстрировало, что добавление Se (группа 2, см. таб. 3) значительно снижает титры АТ-ТПО.

Заключение. Полученные результаты проведенного исследования подтверждают, что селен является микроэлементом, необходимым для функционирования щитовидной железы в качестве активного компонента селенопротеинов и его целесообразно включать в медикаментозный процесс лечения АИТ.

Список литературы

1. Титов А.Ф., Казнина Н.М., Карапетян Т.А. и др. Роль селена в жизнедеятельности растений, животных и человека // Успехи современной биологии. 2021. Т. 141, № 5. С. 443–456.
2. Wang W, Mao J, Zhao J et al. Decreased thyroid peroxidase antibody titer in response to selenium supplementation in autoimmune thyroiditis and the influence of a SEPP gene polymorphism: a prospective, multicenter study in China. *Thyroid*. 2018.
3. Гарднер Д., Шобек Д. Базисная и клиническая эндокринология. Книга 2. М.: БИНОМ, 2018.
4. Тутельян В.А., Княжев В.А., Хотимченко С.А., и др. Селен в организме человека: метаболизм, антиоксидантные свойства, роль в канцерогенезе. М.: Издательство РАМН; 2002.
5. Weetman A.P., McGregor A.M. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev*. 1994.
6. Gärtner R., Gasnier B.C., Dietrich J.W. et al. Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002.
7. Шабалина Е.А., Фадеев В.В. Эффекты фармакологических доз селена на функцию щитовидной железы при аутоиммунном тиреоидите // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2019. Т. 15. №2 | doi: 10.14341/ket10299 // *Clinical and experimental thyroidology*, 2019;15(2).

УДК 612.014.464

*Галкина А.Д., Парменова Е.О.,
Вольхина И.В.*

*Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург
agalkina233@gmail.com, parmenova.ek@mail.com*

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПОРТЕРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ В МЕДИЦИНЕ

Благодаря изучению особенностей строения, механизма действия и способов регуляции работы мембранных транспортеров органических ионов появляются возможности воздействия на содержание в клетках-мишенях, прогнозирования эффективности и безопасности применения медикаментов.

Ключевые слова: *транспортеры органических ионов; транспортеры органических анионов; транспортеры органических катионов; лекарственные средства*

*Galkina A.D., Parmenova E.O., Volkhina I.V.
St. Petersburg State Pediatric Medical University,
St. Petersburg*

PROSPECTS FOR THE USE OF ORGANIC ION TRANSPORTERS IN MEDICINE

Due to the study of the structure, mechanism of action and methods of regulation of the membrane transporters of organic ions there are opportunities to influence the content in target cells, to predict the effectiveness and safety of drugs.

Keywords: *organic ion transporters; organic anion transporters; organic cation transporters; drugs.*

Транспортеры органических ионов являются предметом интенсивных научных исследований вследствие важности для передвижения через мембрану в клетки многих лекарственных препаратов. Также данные переносчики играют значимую роль в выведении ксенобиотиков, продуктов их биотрансформации и эндогенных веществ печенью в желчь и почками в мочу. Поэтому от активности транспортеров зависит нефротоксичность некоторых препаратов [1–3].

Переносчики имеют первостепенное значение в накоплении противоопухолевых лекарств в раковых клетках, влияя на концентрации препаратов в органе-мишени. Серьезной проблемой является лекарственная устойчивость, опосредованная транспортерами, так как экспрессия и функция переносчиков могут подавляться в опухолях [4].

Целями данного исследования стали обобщение и систематизация данных о механизме действия транспортеров органических ионов и способов регуляции их активности, а также перспективы применения данных переносчиков в медицине.

Транспортеры органических ионов — это мембраносвязанные белки семейства переносчиков растворенных веществ (Solute carrier family, SLC), которые осуществляют передвижение различных молекул через плазматические мембраны клеточной стенки и внутриклеточные мембраны эндоплазматического ретикулума, пероксисом и митохондрий. Они состоят приблизительно из 500 аминокислотных остатков и 12 трансмембранных альфа-спиралей.

В зависимости от химической структуры субстрата различают транспортеры органических анионов (ОАТ) и транспортеры органических катионов (ОСТ).

Классификация транспортеров органических ионов основана на их локализации, функции (экспорт или импорт веществ) и субстратной специфичности.

ОАТ располагаются в эпителиальных барьерах различных органов. Преимущественно локализуются в почках и печени. На данный момент выделено десять групп ОАТ, семь из которых найдены у человека (ОАТ1-4, ОАТ6-7 и ОАТ10) и восемь (ОАТ1-3, ОАТ5-6, ОАТ9-10, ОАТ8) обнаружено у лабораторных крыс и мышей [1, 5].

ОСТ находятся в почках, костном мозге, печени плода, кардиомиоцитах, кишечнике. На данный момент у человека выделено 3 изоформы ОСТ [6].

Механизм действия различен для транспортеров органических анионов и катионов.

ОАТ1 и ОАТ3 осуществляют транспорт внутрь клеток в обмен на анионы дикарбоновых кислот (в частности, α -кетоглутарата). Высокая концентрация карбоновых кислот поддерживается за счет специфического Na^+ /анионного переносчика, который в свою очередь запускается при определенном градиенте Na^+ , создаваемого Na^+ / K^+ -АТФазой.

Следует отметить, что α -кетоглутаровая кислота, обмениваемая транспортером на органические анионы при захвате их из крови, является ключевым источником энергии для клеток проксимальных канальцев. Таким образом, поглощение даже нетоксичных для клеток канальцев веществ вызывает равнозначную потерю ими метаболита цикла Кребса [7].

Транспорт органических катионов осуществляется ОСТ независимо от ионов Na^+ , обеспечивая пассивную диффузию большинства катионов по электрохимическому градиенту. На внутренней поверхности клеток животных существует мембранный потенциал с отрицательным зарядом, который транспортеры используют для трансмембранного переноса органических катионов. Это позволяет аккумулировать внутри клетки соответствующие субстраты в концентрациях существенно более высоких, чем снаружи. Фактически транспорт может осуществляться в любом направлении независимо от присутствия ионов Na^+ или рН [6].

К возможным механизмам регуляции транспортеров относятся:

1. Изменения активности ядерных рецепторов (NR), действующих как факторы транскрипции. После связывания эндогенных или экзогенных лигандов (например, лекарств) NR обычно димеризуются с другим NR (обычно рецептором ретиноида X) и впоследствии связываются со специфическими последовательностями ДНК, иницируя транскрипцию множества генов детоксикации. Активация NR приводит к заметному усилению экспрессии и функции транспортеров [8].

2. Изменения липидного состава мембран. Ганглиозиды мембран с разным количеством сиаловых кислот в их составе отличаются по свойствам и функциональным характеристикам. Ферментативное удаление концевых остатков сиаловых кислот осуществляется нейраминидазами (сиалидазами) [9]. Ганглиозиды взаимодействуют с мембранными белками, включая рецепторы и различные транспортеры, для модуляции их активности [10].

3. Эпигенетическая регуляция генов. Процесс метилирования ДНК вызывает добавление метильных групп к цепям ДНК и преимущественно происходит в динуклеотидных CpG-последовательностях в промоторной области гена. В результате транскрипция соответствующего гена может быть подавлена. Ацетилирование и деацетилирование гистонов в основном происходят в остатках лизина на N-конце гистонов, которые обогащены вокруг сайта начала транскрипции и связаны с активацией и инактиваци-

ей генов соответственно. В частности, было обнаружено, что деацетилирование гистонов, в дополнение к гиперметилованию ДНК, имеет значение для подавления SLC22A2 (кодирующего OCT2) при почечно-клеточном раке [8].

4. Посттранскрипционная регуляция МикроРНК, которые представляют собой небольшие некодирующие РНК, связывающиеся с определенными молекулами мРНК, тем самым иницируя их деградацию или блокируя последующие процессы трансляции. Один из примеров, подчеркивающих потенциальную значимость МикроРНК и переносчиков лекарственных средств, связан с различиями в содержании белка Pgp, PEPT1 и MRP3 по длине кишечника человека, что коррелирует с экспрессией регуляторных МикроРНК. Следовательно, факторы окружающей среды, влияющие на характер экспрессии МикроРНК, такие как курение, диета и определенные препараты, могут приводить к изменению количества белка-переносчика. Помимо этого, патологические состояния, например раковые заболевания, были связаны с изменениями в паттерне экспрессии МикроРНК, регулирующих переносчики, и, в свою очередь, с изменениями в экспрессии мРНК и/или содержании соответствующих переносчиков [8].

5. Альтернативный сплайсинг в SLC-транспортерах является распространенным явлением. У SLC22A1 (кодирующего OCT1) были идентифицированы множественные сплайсированные изоформы, генерируемые в результате пропуска экзона, некоторые из которых приводят к потере функции транспортера или плохим исходам у пациентов с раком, получавших иматиниб или сорафениб [8].

6. Посттрансляционные модификации (PTM). Наиболее распространенные PTM включают фосфорилирование, гликозилирование, убиквитинирование, ацетилирование и пальмитоилирование. PTM могут модулировать структуру, свойства и функцию транспортеров, их экспрессию и эффективность действия [8].

Фосфорилирование может приводить к включению / исключению транспортеров. С клинической точки зрения это актуально для пациентов, получающих цисплатин, поскольку TKI, такие как дазатиниб, снижают функцию OCT2 в ткани почек [8].

Гликозилирование транспортеров, в том числе сиалирование, влияет на активность переносчиков и их устойчивость к протеазам [9].

Убиквитинирование приводит к деградации переносчиков SLC и ABC, поэтому баланс между убиквитинированием и деубиквитини-

рованием может регулировать активность переносчиков в мембране [8].

Пальмитоилирование происходит в остатках цистеина вблизи границы раздела белок-липид. Оно может приводить к быстрому эндоцитозу или повышению эффективности переносчиков за счет кластеризации. Этот механизм был описан для транспортеров SLC и ABC, участвующих в транслокации холестерина [8].

Важно отметить, что в результате нарушения механизмов регуляции транспортеров при опухолях развивается лекарственная устойчивость, так как переносчики преимущественно ответственные за поглощение противоопухолевых препаратов клетками (представители семейств SLC22 и SLCO) более высоко экспрессируются в здоровых тканях, чем в опухолях, что служит причиной неблагоприятного распределения лекарственных средств. Это приводит к неэффективности лечения, а попытки повысить дозировку — к системной токсичности. Поэтому важно знать конкретный механизм, вызывающий низкую экспрессию транспортеров при различных типах рака, чтобы использовать необходимые средства для повышения экспрессии белков. Например, ядерные факторы гепатоцитов (HNF) представляют собой факторы транскрипции, которые регулируют транскрипцию широкого спектра генов, включая SLC-транспортеры SLCO1B1, SLCO1B3, SLCO2B1, SLC22A1, SLC22A6 и SLC22A7. Экспрессия SLCO1B1 и SLCO1B3 стимулируется HNF1a и HNF4a, SLCO1B3 подавляется HNF3 β , а SLCO2B1 регулируется HNF4a. При гепатоцеллюлярной карциноме повышенная экспрессия HNF3 β подавляет экспрессию SLCO1B3 [4].

Лекарственные средства могут конкурировать с эндогенными и экзогенными субстратами за связывание с транспортером. При этом уменьшается их почечная секреция и продлевается время нахождения лекарственного вещества (или его метаболита) в крови.

Подобный эффект используется в целях пролонгирования действия лекарственных средств [7]. Например, пробенецид конкурентно ингибирует реабсорбцию мочевой кислоты через OAT-1 в проксимальных канальцах. Это приводит к преимущественной реабсорбции пробенецида обратно в плазму и выведению мочевой кислоты с мочой.

Среди же транспортеров органических катионов наиболее глубоко изучено их влияние на фармакокинетику метформина [6]. Это гипогликемический препарат, применяемый при лечении

сахарного диабета 2-го типа и ожирении. Метформин поступает в клетки органов-мишеней через 1-й тип транспортеров органических катионов, а выходит из клеток — через 2-й тип. Из этого следует, что прием метформина одновременно с ингибиторами ОСТ первого типа может уменьшать эффективность метформина, а прием данного препарата с индукторами ОСТ 1-го типа — увеличивать эффективность, повышая его захват энтероцитами кишечника. В свою очередь ингибиторы транспортера катионов 2-го типа препятствуют выходу метформина из клеток, значительно пролонгируя его действие. Это необходимо учитывать в процессе расчета дозировки метформина при одновременном его применении с ингибиторами или индукторами ОСТ.

Активность переносчиков лекарств в эпителиальных клетках почечных канальцев также может играть важную роль в нефротоксичности, опосредуя накопление лекарств в клетках. Цисплатин единственный среди платиновых противоопухолевых препаратов вызывает нефротоксичность. Прием цисплатина совместно с ингибиторами транспортеров органических катионов значительно снижает его токсичность. Наиболее часто используемым ингибитором транспортеров органических катионов является циметидин [3, 6].

Медицинское значение транспортеров органических ионов заключается в их способности переносить различные ксенобиотики и их метаболиты внутрь и из клетки, а также пролонгировать действие различных препаратов, или, наоборот, увеличивать скорость выведения токсичных веществ (посредством ингибиторов и индукторов транспортеров или конкурентного действия при связывании с транспортером различных веществ). Также в будущем, имея больше информации о причинах нарушений механизмов регуляции транспортеров при разных видах опухолей, возможно улучшить эффективность противоопухолевых препаратов, снизив лекарственную устойчивость.

Список литературы

1. Мильто Е.В., Волчек А.В. Фармакология транспортеров органических ионов // Рецепт. 2016. №6. С. 704-713.
2. Chen Y., Lu S., Zhang Y., Chen B., Zhou H., Jiang H. Examination of the emerging role of transporters in the assessment of nephrotoxicity // Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2022. №18(11). P. 787-804. DOI: 10.1080/17425255.2022.2151892

3. Łapczuk-Romańska J., Drożdżik M., Oswald S., Drożdżik M., Drug K. Transporters in Pharmacotherapy // *Int J Mol Sci.* 2023. №24(3). P. 2856. DOI: 10.3390/ijms24032856
4. Puris E., Fricker G., Gynther M. The Role of Solute Carrier Transporters in Efficient Anticancer Drug Delivery and Therapy // *Pharmaceutics.* 2023. №15(2). P. 364. DOI: 10.3390/pharmaceutics15020364
5. Смирнов Л.П., Суховская И.В., Борвинская Е.В. Транспортёры органических анионов (ОАТ). Молекулярное разнообразие, структура, функция, участие в функционировании системы биотрансформации ксенобиотиков у животных (обзор) // *Труды Карельского научного центра РАН.* 2017. №12. С. 28-42. DOI: 10.17076/eb622
6. Евтеев В.А., Казаков Р.Е., Муслимова О.А., Демченкова Е.Ю. Фармокинетика основных представителей транспортеров органических катионов // *Безопасность и риск фармакотерапии.* 2018. №2. С. 78-85. DOI: 10.30895/2312-7821-2018-6-2-78-85
7. Евтеев В.А., Муслимова О.В., Мазеркина И.А., Бунятян Н.Д., Ших Е.В., Казаков Р.Е. Транспортёры органических анионов и их влияние на токсичность β-лактамноантибиотиков. Безопасность и риск фармакотерапии // *Безопасность и риск фармакотерапии.* 2017. №2. С. 70-75.
8. Brouwer K., Evers R., Hayden E., Hu S., Li C.Y., Schwabedissen H. et al. Regulation of Drug Transport Proteins-From Mechanisms to Clinical Impact: A White Paper on Behalf of the International Transporter Consortium // *Clin Pharmacol Ther.* 2022. №112(3). P. 461-484. DOI: 10.1002/cpt.2605
9. Вольхина И.В., Бутолин Е.Г., Данилова Л.А. Перспективы использования показателей обмена сиаловых кислот в медицине // *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021. 66(7). С. 389-395. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-7-389-395
10. Pshezhetsky A.V., Ashmarina M. Keeping it trim: roles of neuraminidases in CNS function // *Glycoconj J.* 2018.- 35(4). P. 375-386. DOI: 10.1007/s10719-018-9837-4.

УДК 575.1:616.1

*Голованова Н.Э.^{1,2}, Басанько А.В.³, Астратенкова И.В.¹,
Лукьянова И.Ю.^{1,2}*

*¹СПбГУ, ²ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург*

*³Медицинский университет Персидского залива
Аджман, ОАЭ*

*nesh1764@mail.ru, 9xaasaax9@gmail.com, astratenkova@mail.ru,
irina.loukianova@yahoo.com*

СОЧЕТАНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ADRB1 И SOD2 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В статье представлен анализ встречаемости полиморфизма гена, кодирующего β_1 -адренорецептор (ADRB1, Gly389Arg, rs1801253) и гена супероксиддисмутазы (SOD2, C47T, rs4880), как возможных предикторов на повышение вероятности развития и прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: полиморфизм генов, антиоксидантная система, супероксиддисмутаза, β_1 -адренорецептор, сердечно-сосудистые заболевания.

*Golovanova N.E.^{1,2}, Basanko A.V.³, Astratenkova I.V.¹,
Lukyanova I.Y.^{1,2}*

*¹SPbSU, ²North-Western State Medical University named after
I.I. Mechnikov,
St. Petersburg*

*³Gulf Medical University,
Ajman, United Arab Emirates*

COMBINATION OF POLYMORPHIC VARIANTS GENES OF THE ADRB1 AND SOD2 WITH THE RISK OF DEVELOPING CARDIOVASCULAR DISEASES

This article presents an analysis of the occurrence of polymorphisms of the gene encoding the β_1 -adrenergic receptor (ADRB1, Gly389Arg, rs1801253) and the superoxide dismutase gene (SOD2, C47T, rs4880), as possible predictors of an increase in the likelihood of the development and progression of cardiovascular diseases.

Keywords: gene polymorphisms, antioxidant system, β_1 -adrenergic receptor, superoxide dismutase, cardiovascular diseases.

Введение. Ведущую роль в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы играет вегетативная нервная система. Именно она претерпевает значимые изменения при развитии и прогрессировании таких заболеваний, как гипертоническая болезнь, хроническая сердечная недостаточность и др. [1]. Длительная активация адренорецепторов, приводит к их десенситизации, которая является естественной формой ограничения в химических синапсах, и снижению компенсаторных механизмов, поддерживаемых увеличением лиганда [2, 3]. В норме для кардиомиоцитов характерно преобладание β 1-адренорецепторов. Так как полиморфные варианты гена β 1-адренорецептора могут определять характер рецепторного ответа — исследования однонуклеотидных полиморфизмов гена являются актуальными. Характер патологии сердца у конкретного пациента может зависеть от индивидуальной особенности данного рецептора. Более того в восстановлении чувствительности адренорецепторов большую роль играют β -адреноблокаторы, однако индивидуальный полиморфизм гена ADRB1 не позволяет у некоторых пациентов применять стандартные дозировки лекарственных средств и может приводить к быстрому развитию побочных эффектов [4].

Наиболее интересными полиморфизмами гена β 1-адренорецептора (ADRB1) являются Gly389Arg и Ser49Gly. Полиморфизм локуса 1165G>C сопровождается заменой аргинина (Arg) (аллель C) на глицин (Gly) (аллель G) в аминокислоте 389. Локус Gly389Arg локализован на карбокситерминальном участке пептидной цепи с внутриклеточной поверхности мембраны клетки и располагается в домене, определяющем взаимодействие с G белком. Полиморфизм локуса 145A>G сопровождается заменой серина (Ser) на Gly в аминокислоте 49.

Как хорошо известно, в патогенез заболеваний сердечно-сосудистой системы весомый вклад вносят активные формы кислорода (АФК). Повышение продукции АФК, индуцируя внутриклеточные сигнальные механизмы, способствует активизации воспалительного процесса, гипертрофических и фиброзных изменений в миокарде [5]. АФК способны повреждать ферментные комплексы дыхательной цепи и ЦТК, митохондриальную ДНК, изменять активность транскрипционных факторов. Важнейшим звеном антиоксидантной системы является фермент супероксиддисмутаза, который позволяет поддерживать физиологическую концентрацию супероксидных радикалов в тканях.

Митохондриальная Мп-зависимая супероксиддисмутаза имеет полиморфизм Ala16Val (С47Т, s4880) приводящий к замене аланина (Ala) на валин (Val). Данный полиморфизм локализован в участке, отвечающем за связывание с митохондрией для транспортировки фермента в митохондриальный матрикс. Известно, что фермент, содержащий в этой позиции Val, трансформируется в митохондриальный матрикс медленнее, поэтому присутствие аллеля Val и генотипа Val/Val сопровождается большей выраженностью окислительных повреждений [6]. У носителей данного аллеля гена SOD2 наблюдается уменьшение активности фермента в митохондриях на 30–40% и возрастает риск развития сердечно-сосудистой патологии.

Цель работы: исследовать частоту встречаемости полиморфизмов генов ADRB1 и SOD2 и оценить возможный риск развития и прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 51 человек в возрасте от 18 до 22 лет (русская популяция), на данный момент не имеющих патологии со стороны сердечно-сосудистой системы. Все обследованные подписали информированное согласие об участии в исследовании. Геномную ДНК выделяли из эпителиальных клеток ротовой полости, используя коммерческий набор «ДНК-сорб-А» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва). Генотипирование образцов ДНК проводили с использованием наборов реагентов для ПЦР в реальном времени фирмы «Синтол» (Москва). Определение полиморфных вариантов генов выполняли на приборе «Real-time CFX96 Touch» (BioRad, США) в лаборатории Научного парка СПбГУ (центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий»). У испытуемых определяли полиморфизм гена ADRB1 (Gly389Arg, rs1801253), кодирующего β 1- адренергический рецептор и гена SOD2 (С47Т, rs4880), кодирующего митохондриальную супероксиддисмутаза.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования частоты встречаемости полиморфизма Gly389Arg гена ADRB1 в обследованной группе: Arg/Arg — 0,51, Gly/Arg — 0,47, Gly/Gly — 0,02. Частота встречаемости аллелей распределилась соответственно: С — 0,745 и G — 0,255. Результаты исследования частоты встречаемости полиморфизма С47Т гена SOD2 в обследованной группе: Ala/Ala — 0,31, Ala/Val — 0,49, Val/Val — 0,2. Частота встречаемости аллелей распределилась соответственно: С — 0,555 и Т — 0,455.

При оценке сочетания полиморфизмов исследованных генов (ADRB1/SOD2) обнаружено, что генотип СС/СС присутствует у 10

человек; CC/CT — у 9; CC/TT — у 7; CG/CC — у 5; CG/CT — у 14; CG/TT — у 3; GG/CC — у 1; GG/CT — у 2 человек. Из полученных сочетаний видно, что для 47,05% обследованных в данной группе риск развития сердечно-сосудистых заболеваний не подкрепляется генетическими факторами, так как включает не более 1 неблагоприятного аллеля. Генотип 52,95% обследованных включает 2 или 3 неблагоприятных аллеля, что указывает на наличие у них наследственной предрасположенности к развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Для 3 человек с предрасположенностью, сочетание GG/CC и GG/CT позволяет предположить риск прогрессирования патологии (нарушения ритма сердца, фибрилляция предсердий, развитие хронической сердечной недостаточности).

Список литературы

1. Манешина О.А., Леонова М.В., Белоусов Ю.Б. Состояние и функционирование бета-адренорецепторов и их модификация на фоне лечения бета-блокаторами больных с артериальной гипертензией и с хронической сердечной недостаточностью // Российский кардиологический журнал. 2005. № 5. С.80–86.
2. Гиниатуллин Р.А. Десенситизация в холинергическом синапсе: механизмы и физиологическая роль // Казанский медицинский журнал. 1994. №3(75). С. 177–180.
3. Афанасьев С. А., Реброва Т. Ю., Муслимова Э. Ф., Борисова Е. В. Ассоциация полиморфных вариантов гена ADRB1 с сократительной дисфункцией миокарда и адренореактивностью эритроцитов у пациентов с нарушениями ритма // Российский кардиологический журнал. 2019. №24(7). С.47–52.
4. Ларина В.Н., Леонова М.В. Генетический полиморфизм бета1-адренорецепторов и влияние на клиническую эффективность бета-адреноблокаторов // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. 2021. №5(17). С.752–760.
5. Лобанова О.А., Голованова Н.Э., Гайковая Л.Б. Роль митохондриальной дисфункции и нарушений энергетического обмена в патогенезе хронической сердечной недостаточности // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2017. № 6 (103). С. 606–616.
6. Первушина О.А., Баирова Т.А., Колесникова Л.И. Полиморфизм Ala16Val гена супероксиддисмутазы 2 (SOD2) у подростков-европеоидов с эссенциальной артериальной гипертензией, проживающих в Восточной Сибири // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2014. № 6 (100). С.111–114.

УДК 577.17

Деркач К.В., Басова Н.Е., Шпаков А.О.
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург alex_shpakov@list.ru

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ МЕТФОРМИНА С РАЗЛИЧНЫМИ ДОЗАМИ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ИНСУЛИНА НА ГЛЮКОЗНЫЙ ГОМЕОСТАЗ И ИНСУЛИНОВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Комбинированное применение метформина с интраназально вводимым инсулином (ИВИ) в дозах 6 и 15 МЕ/кг/сутки приводит к более выраженному в сравнении с монотерапией метформином восстановлению глюкозного гомеостаза и инсулиновой чувствительности у крыс Wistar с сахарным диабетом 2-го типа, в то время как применение ИВИ в дозе 1.5 МЕ/кг/сутки было менее эффективным.

Ключевые слова: инсулин, метформин, интраназальное введение, сахарный диабет, глюкозный гомеостаз.

Derkach K.V., Basova N.E., Shpakov A.O.
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian
Academy of Sciences, St. Petersburg

INFLUENCE OF THE COMBINATION OF METFORMIN WITH DIFFERENT DOSES OF INTRANASAL INSULIN ON GLUCOSE HOMEOSTASIS AND INSULIN SENSITIVITY IN RATS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

The combined use of metformin with intranasally administered insulin (IAI) at the doses of 6 and 15 IU/kg/day leads to a more pronounced restoration of glucose homeostasis and insulin sensitivity in Wistar rats with type 2 diabetes mellitus compared to metformin monotherapy, while the use of IAI at a dose of 1.5 IU/kg/day was less effective.

Keywords: insulin, metformin, intranasal administration, diabetes mellitus, glucose homeostasis.

Введение. При сахарном диабете 2-го типа (Т2СД), наряду с метаболическими и гормональными нарушениями, снижается активность инсулиновой системы мозга. Это приводит к негативным последствиям, которые утяжеляют течение Т2СД и ухудшают его про-

гноз, в том числе нарушают центральную регуляцию инсулиновой чувствительности и глюкозного гомеостаза и усиливают инсулиновую резистентность (ИР) и гипергликемию на периферии. Среди причин ослабления инсулиновой системы мозга ослабление проницаемости гематоэнцефалического барьера для циркулирующего в крови инсулина. Одним из подходов для предотвращения этого при Т2СД является применение интраназально вводимого инсулина (ИВИ), который при введении в полость носа беспрепятственно, по аксональным путям, поступает в мозг [1]. Важно, что применение ИВИ в низких и средних дозах не приводит к опасным для жизни пациентов гипогликемическим эпизодам, а при длительном применении не усиливает ИР и, тем самым, не ухудшает транспорт в мозг циркулирующего в крови эндогенного инсулина [2]. Другим общепринятым подходом для коррекции метаболических и гормональных нарушений при Т2СД является применение антидиабетического препарата метформина (МФ), но он не всегда эффективен, а длительные курсы сравнительно высоких доз МФ приводят к ряду серьезных побочных эффектов [3]. Для снижения доз и повышения эффективности МФ может быть использована его комбинация с ИВИ, что ранее было впервые продемонстрировано нами [4]. Однако, не было изучено, как доза ИВИ влияет на способность его комбинации с МФ улучшать метаболические и гормональные показатели у крыс с Т2СД. Цель работы состояла в изучении влияния комбинации МФ в дозе 100 мг/кг/сутки в комбинации с ИВИ в дозах 1.5, 6 и 15 МЕ/кг/сутки на уровень глюкозы, толерантность к глюкозе, ИР у крыс с Т2СД, вызванным высокожировой диетой (ВЖД) и низкой дозой стрептозотоцина (СТЦ).

Материалы и методы. Для экспериментов использовали самцов крыс Wistar, которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. При их проведении следовали требованиям European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС), «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и Этического комитета ИЭФБ РАН.

Модель Т2СД вызывали высокожировой диетой, которую крысы, начиная с двухмесячного возраста, потребляли в течение 20 недель, причем через 12 недель животные получали инъекцию низкой дозы СТЦ (15 мг/кг, в/б). Через 2 недели после СТЦ-инъекции у животных оценивали массу тела и уровень глюкозы до и через 120 мин после глюкозной нагрузки. В качестве диабетических рассматривали крыс с превышением массы тела в среднем на 8% в сравне-

нии с контрольной группой, а также с уровнем глюкозы через 120 мин после нагрузки в диапазоне от 7 до 12 мМ. Контрольные животные получали стандартную диету и вместо СТЦ им вводили его растворитель (0.1 М натрий-цитратный буфер). В дальнейшем крыс случайным образом распределяли на экспериментальные группы и проводили их лечение МФ, ИВИ и их комбинациями в течение 3 недель. В результате были сформированы 9 групп (по 6 крыс в каждой): контроль (К), Т2СД-крысы без лечения (Д), Т2СД-крысы с лечением отдельно МФ (100 мг/кг, перорально) (ДМ) и ИВИ в дозах 1.5, 6 и 15 МЕ/кг/сутки (ДИ-1.5, ДИ-6, ДИ-15), Т2СД-крысы с лечением совместно МФ и ИВИ в различных дозах (ДМИ-1.5, ДМИ-6, ДМИ-15). В конце эксперимента проводили интраперитонеальный глюкозотолерантный тест (ИГТТ), для чего животным в/б вводили глюкозу (2 г/кг), измеряя в крови уровни глюкозы до и через 15, 30, 60 и 120 мин и уровни инсулина до и через 120 мин после глюкозной нагрузки. Оценивали значение AUC_{0-120} , как интегрированную площадь под кривыми зависимости концентрации глюкозы (ммоль/л) от времени (мин). Уровень глюкозы определяли с помощью глюкометра и тест-полосок «One-Touch Select Ultra» (Life Scan, США), уровень инсулина — ИФА-набором фирмы «Insulin Rat ELISA» (Mercodia AB, Швеция). В крови оценивали концентрацию гликированного гемоглобина (HbA1C), используя набор «Multi Test HbA1c System» (Polymer Technology Systems, Inc., США). Затем крыс анестезировали хлоральгидратом (400 мг/кг, в/б) и декапитировали, оценивая массу жировой ткани.

Статистический анализ проводили с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007» (США), результаты представляли в виде $M \pm SEM$. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Масса тела и жировой ткани у Т2СД-крыс были значимо выше, чем в контрольной группе (табл. 1). Повышались уровень глюкозы и концентрация HbA1C в крови, значение AUC_{0-120} , демонстрирующее прирост уровня глюкозы в ИГТТ в течение 120 мин после глюкозной нагрузки, базовый и стимулированный (через 120 мин после нагрузки) уровни инсулина в крови, а также индекс ИР, рассчитанный как произведение базовых концентраций глюкозы и инсулина (табл. 1, 2). МФ терапия частично восстанавливала эти показатели, в то время как монотерапия исследуемыми дозами ИВИ была менее эффективной, за исключением улучшения инсулиновой чувствительности в группе ДИ-15 (табл. 1, 2).

Совместное применение МФ и ИВИ в низкой дозе 1.5 МЕ/кг/сутки улучшало восстанавливающий эффект МФ только в отношении значения AUC_{0-120} и индекса ИР, что указывает на потенцирование эффекта МФ в отношении нормализации толерантности к глюкозе и периферической инсулиновой чувствительности, но при этом другие оцениваемые показатели в группе ДМИ-1.5 не отличались от группы ДМ (табл. 1, 2). При комбинированной терапии более эффективными были дозы ИВИ 6 и 15 МЕ/кг/сутки (эти дозы являются средними для ИВИ при обработке крыс), которые в сравнении с монотерапией МФ в большей степени снижали содержание $HbA1C$ в крови, значения AUC_{0-120} и индекс ИР, причем индекс ИР не отличался от такового в контроле. В сравнении с группой ДМ, комбинация МФ и ИВИ в дозе 6 МЕ/кг/сутки была более эффективна в отношении снижения массы тела, а комбинация МФ с ИВИ в дозе 15 МЕ/кг/сутки — в отношении уровня глюкозы и стимулированного глюкозой уровня инсулина в крови (табл. 1, 2).

Таблица 1. Масса тела и жировой ткани, уровень глюкозы и содержание гликированного гемоглобина у крыс с Т2СД и влияние на них лечения метформинном, различными дозами ИВИ и комбинациями этих препаратов

Группа крыс	Масса тела, г	Масса жира, г	Глюкоза, ммоль/л	$HbA1C$, %
К	351±15	7,7±1,1	4,4±0,1	4,2±0,1
Д	449±17 ^a	23,8±1,5 ^a	6,5±0,3 ^a	7,1±0,2 ^a
ДМ	398±14 ^{a,b}	14,3±1,4 ^{a,b}	5,1±0,2 ^{a,b}	5,7±0,2 ^{a,b}
ДИ-1.5	429±20 ^a	20,5±2,2 ^a	5,4±0,3 ^{a,b}	6,4±0,1 ^{a,b}
ДИ-6	438±16 ^a	21,4±1,6 ^a	5,1±0,2 ^{a,b}	6,4±0,2 ^{a,b}
ДИ-15	427±25 ^a	19,2±1,0 ^{a,b}	5,0±0,3 ^{a,b}	6,1±0,3 ^{a,b}
ДМИ-1.5	375±23 ^b	10,8±0,7 ^{a,b}	5,0±0,2 ^{a,b}	5,5±0,3 ^{a,b}
ДМИ-6	360±11 ^{b,c}	9,1±1,6 ^b	4,6±0,2 ^b	5,0±0,1 ^{a,b,c}
ДМИ-15	385±21 ^b	10,7±1,9 ^b	4,4±0,2 ^{b,c}	4,9±0,2 ^{a,b,c}

Примечание. Различия между группой К и диабетическими группами (^a), между группой Д и диабетическими группами с лечением (^b) и между группой ДМ и группами ДМИ-1.5, ДМИ-6 и ДМИ-15 (^c) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n=6$.

Таблица 2. Значения AUC_{0-120} для глюкозы по результатам ИГТТ, базовый и стимулированный глюкозой уровни инсулина в крови и значения ИР у крыс с Т2СД и влияние на них лечения метформином, различными дозами ИВИ и комбинациями этих препаратов

Группа крыс	AUC_{0-120} , усл.ед.	Инсулин, баз., нг/мл	Инсулин, стим., нг/мл	ИР, усл. ед.
К	1185±48	0,69±0,11	0,74±0,15	2,73±0,19
Д	2239±61 ^a	1,02±0,13 ^a	2,39±0,24 ^a	6,68±0,44 ^a
ДМ	1760±40 ^{a,b}	0,90±0,15	1,47±0,16 ^{a,b}	4,55±0,30 ^{a,b}
ДИ-1.5	2078±72 ^a	0,95±0,17	1,90±0,23 ^a	5,17±0,38 ^{a,b}
ДИ-6	1916±38 ^{a,b}	0,88±0,16	1,81±0,27 ^a	4,57±0,36 ^{a,b}
ДИ-15	1937±68 ^a	0,73±0,11 ^b	1,70±0,15 ^{a,b}	3,78±0,35 ^{a,b}
ДМИ-1.5	1502±36 ^{a,b,c}	0,70±0,17	1,26±0,24 ^b	3,52±0,33 ^{a,b,c}
ДМИ-6	1427±43 ^{b,c}	0,58±0,14 ^b	1,11±0,17 ^b	2,64±0,26 ^{b,c}
ДМИ-15	1395±48 ^{b,c}	0,62±0,11 ^b	0,89±0,14 ^{b,c}	2,80±0,23 ^{b,c}

Примечание: AUC_{0-120} — интегрированная площадь под кривой концентрация глюкозы (ммоль/л)—время (мин), включающая временной промежуток 120 мин от момента инъекции глюкозы с 5 измерениями уровня глюкозы (до и через 15, 30, 60 и 120 мин после нагрузки). Различия между группой К и диабетическими группами (а), между группой Д и диабетическими группами с лечением (b) и между группой ДМ и группами ДМИ-1.5, ДМИ-6 и ДМИ-15 (с) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n=6$.

Полученные нами данные указывают на перспективы совместного применения МФ и ИВИ в средних дозах для нормализации глюкозного гомеостаза и инсулиновой чувствительности при Т2СД, поскольку эта комбинация более эффективна, чем монотерапия МФ, и не ассоциирована с побочными эффектами МФ, которые отмечаются при лечении высокими дозами МФ, включая лактоацидоз [5]. Возможными механизмами, лежащими в основе усиления восстанавливающих эффектов МФ и ИВИ при их совместном применении, могут быть улучшение центральной регуляции пищевого поведения и периферического метаболизма вследствие активации ИВИ

инсулиновой системы мозга [1], а также положительное влияние МФ на инсулиновую сигнальную трансдукцию в мозге вследствие нормализации энергетического статуса нейронов [6].

Работа поддержана Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2022-296, на создание и развитие научного центра мирового уровня «Павловский центр «Интегративная физиология — медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости».

Список литературы

1. Shpakov A.O. Hot spots for the use of intranasal insulin: cerebral ischemia, brain injury, diabetes mellitus, endocrine disorders and postoperative delirium / A.O. Shpakov, I.I. Zorina, K.V. Derkach // International journal of molecular sciences. 2023. V. 24. № 4. 3278. doi: 10.3390/ijms24043278.

2. Aponte Becerra L. Safety of Intranasal Insulin in Type 2 Diabetes on Systemic Insulin: A Double-Blinded Placebo-Controlled Sub-Study of Memaid Trial / L. Aponte Becerra, B. Galindo Mendez, F. Khan, V. Lioutas, P. Novak, C.S. Mantzoros, L.H. Ngo, V. Novak // Archives of diabetes and obesity. 2022. V. 4. No 2. P, 403-415.

3. Corcoran C., Jacobs T.F. Metformin // In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL) / StatPearls Publishing, 2023.

4. Деркач К.В. Совместное применение метформина и интраназального инсулина нормализует чувствительность к глюкозе и гормональный статус у крыс с диабетом 2 типа / К.В. Деркач, В.М. Бондарева, Н.Е. Басова, Л.А. Кузнецова, А.О. Шпаков // Интегративная физиология. 2021. Т. 2. № 4. С. 399–411. doi: 10.33910/2687-1270-2021-2-4-399-411.

5. Theurey P. Reduced lactic acidosis risk with Imeglimin: Comparison with Metformin / P. Theurey, G. Vial, E. Fontaine, P.A. Monternier, P. Fouqueray, S. Bolze, D.E. Moller, S. Hallakou-Bozec // Physiological reports. 2022. V. 10. No 5. e15151. doi: 10.14814/phy2.15151.

6. Kazkayasi I. Intranasal metformin treatment ameliorates cognitive functions via insulin signaling pathway in ICV-STZ-induced mice model of Alzheimer's disease / I. Kazkayasi, G. Telli, E. Nemutlu, S. Uma // Life Sciences. 2022. V. 299. 120538. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120538.

УДК 544.773.432

*Захаров А.С., Василевский И.Н., Нозадзе Н.Д.,
Короткова Н.В., Мжаванадзе Н.Д.
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
Рязань
AlexanderZakharov2019@yandex.ru*

РАЗРАБОТКА ПЕРОКСИНИТРИТ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ БИОПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Альгинат натрия — популярный в биомедицине материал для получения гидрогелевых скаффолдов, обладающий, тем не менее, слабой способностью к адгезии клеток. В данной статье авторы приводят методику модификации гидрогелей на основе альгината натрия с оценкой изменений его химической структуры и культивированием фибробластов на его поверхности.

Ключевые слова: альгинат натрия, желатин, пероксинитрит, фибробласты, цитосовместимость.

*Zakharov A.S., Vasilovsky I.N., Nozadze N.D.,
Korotkova N.V., Mzhavanadze N.D.
Ryazan State Medical University,
Ryazan*

DEVELOPMENT OF PEROXYNITRITE-MODIFIED BIOPOLYMER HYDROGELS FOR CELL CULTIVATION

Sodium alginate is a popular material for biomedicine used for the production of hydrogel scaffolds, which, nevertheless, has a weak ability to adhere cells. In this article, the authors present a technique for modifying sodium alginate-based hydrogels with an assessment of changes in its chemical structure and cultivation of fibroblasts on its surface.

Keywords: sodium alginate, gelatin, peroxy nitrite, fibroblasts, cytocompatibility.

Введение. Биомедицина и биоинженерия — науки, применяющие биоматериалы и технологии клеточного культивирования для создания конструкций, улучшающих регенерацию или заменяющих в организме человека органы с нарушенным функционированием и структурой [1, 2]. Одним из популярных веществ для получения таких разработок является альгинат натрия, способный поглощать большое количество воды и образовывать гидрогели. Наряду с пре-

имуществами таких гидрогелей (удовлетворительная прочность, длительное поддержание формы, легкость полимеризации), у них имеются и существенные недостатки: слабые адгезивные свойства и невозможность напрямую взаимодействовать с пептидами, их улучшающими.

В данной статье мы представляем методику модификации альгината натрия с оценкой изменений его химической структуры и культивированием фибробластов на поверхности разработанных гидрогелей.

Материалы и методы. Синтез пероксинитрита. Раствор пероксинитрита получали во льду путем добавления к смеси 10 мл 3% (масса/объем) пероксида водорода и 340 мкл 96% (масса/объем) серной кислоты моментально 10 мл 1М раствора нитрита натрия и 15 мл 2М раствора гидроксида натрия. Избыток пероксида водорода разлагали диоксидом марганца, осадок которого затем отфильтровывали. Концентрацию пероксинитрита оценивали колориметрически на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 302 нм ($E_{302} = 1670 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Чистоту раствора пероксинитрита оценивали йодометрическим титрованием для вычисления примесей пероксида водорода и спектрофотометрически посредством воздействия реактивом Грисса для вычисления примесей нитритов. Данные эксперименты проводились с подкисленной аликвотой раствора для предварительного разложения пероксинитрита.

Модификация альгината натрия. Модификацию альгината натрия раствором проводили следующим образом: 4 г альгината натрия (ALG) помещали в две мерные колбы, добавляли смесь раствора пероксинитрита и 95% этанола в соотношении 1:1. Их выдерживали в течение 20 ч при 37 °, после чего осадок отделяли фильтрованием, трижды промывали 95% этанолом и высушивали. Таким образом получали 2 образца модифицированного альгината: № 1 (mALG1) — в присутствии 10 мл пероксинитрит-спиртовой смеси, № 2 (mALG2) — при 50 мл смеси.

Характеристика модифицированных альгинатов. Для оценки модификации альгината натрия получали спектры поглощения 0,1% (масса/объем) растворов модифицированных и интактного альгинатов, рН которых предварительно доводили до 7,0-7,1.

Карбонильные группы определяли гидроксиламин-гидрохлоридным титрованием: 1 мл 1% (масса/объем) растворов модифицированных и интактного альгинатов с рН=6,98-7,02 смешивали

с 5 мл 5% (масса/объем) раствора хлорида гидроксиламмония и 4 мл дистиллированной воды. Смесь выдерживали 15 минут в темном месте при 25° и оттитровывали 0,05 М раствором гидроксида натрия в присутствии метилоранжа до желтой окраски. Содержание карбонильных групп в модифицированных альгинатах рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{COH mod}} \% = \frac{V_{\text{mod}} * 100\%}{V_{\text{int}}}$$

Содержание карбоксильных групп оценивали по адсорбции альгинатными гранулами красителя метиленового синего: гранулы, полученные добавлением по каплям 1% растворов модифицированных и интактного альгината натрия по каплям добавляли в 2% (масса/объем) раствор хлорида кальция добавляли к 10 мл 0,01% (масса/объем) раствора метиленового синего. Спустя час их удаляли из раствора и сравнивали оптические плотности опытных растворов с контрольным (0,01% раствор метиленового синего) на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 665 нм. Содержание карбоксильных групп в модифицированных альгинатах рассчитывали по формуле: .

$$C_{\text{COOH mod}} \% = \frac{(D_{665 \text{ ctrl}} - D_{665 \text{ mod}}) * 100\%}{D_{665 \text{ ctrl}} - D_{665 \text{ int}}}$$

Нитрогруппы определяли спектрофотометрически при помощи реактива Грисса подобно описанному выше, но 0,1% растворы альгинатов предварительно подщелачивали и выдерживали при 50 °С в течение 30 мин для перехода нитрогрупп в свободные нитрит-ионы.

Приготовление гидрогелей. Для приготовления гидрогелей 2 г каждого образца альгината натрия растворяли в 100 мл физиологического раствора при 40 °С, добавляли 3 г желатина (GEL). К модифицированным альгинатным гидрогелям добавляли также 2 г интактного альгината натрия. Образцы стерилизовали автоклавированием. В ламинарном боксе в 96-луночных планшетах гели в объеме 50 мкл/луночка охлаждали при 4 °С до застывания и полимеризовали 50 мкл 2% раствора хлорида кальция в течение 15 мин. Затем к ним добавляли раствор микробиальной трансглутаминазы *Streptovorticillium mobaranse* (mTG) 300 МЕ/мл в культуральной среде в соотношении 1:1. Таким образом получали гидрогели

ALG(2)G(3)TG, ALG(2) mALG_{1 (2)} G(3)TG, ALG(2) АКГ mALG_{1 (2)}G(3)TG.

Клеточное культивирование. В качестве экспериментальной культуры использовали первичную культуру фибробластов человека, которую растили до состояния монослоя в присутствии среды DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% пенициллин-стрептомицина в условиях инкубатора при 37 °С и 5% CO₂. Фибробласты высаживали на поверхность гидрогелей из расчета 20000 клеток/лунка. Рост клеток оценивали путём фазово-контрастной и светлопольной микроскопии на 3-й и 7-й дни культивирования.

Оценка жизнеспособности клеток. Жизнеспособность фибробластов на поверхности гелей оценивали на 3 и 7 день культивирования при помощи МТТ-теста: в среду добавляли 20 мкл 0,5% (масса/объем) раствора МТТ-реактива в дистиллированной воде и инкубировали 3 часа. Далее среду заменяли на 100 мкл диметилсульфоксида и после 30 мин обработки в шейкере-инкубаторе при 37°С оптическая плотность растворов считывалась на планшетном ридере StatFax 2100 в режиме 492/630 нм.

Статистический анализ. Анализ данных проводился в программе SPSS Statistics 23.0 (IBM, США). Анализ выборок на нормальность не проводился в виду количества повторностей менее 10, распределение считалось ненормальным. Сравнение пары выборок осуществляли критерием Манна-Уитни, множественные сравнения — критерием Краскела-Уоллиса и последующим критерием Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

Результаты и обсуждение. Был получен раствор пероксинитрита концентрацией 37 мМ с 1,46% примесей пероксида водорода (0,54 мМ) и 8,37% нитрита натрия (3,1 мМ).

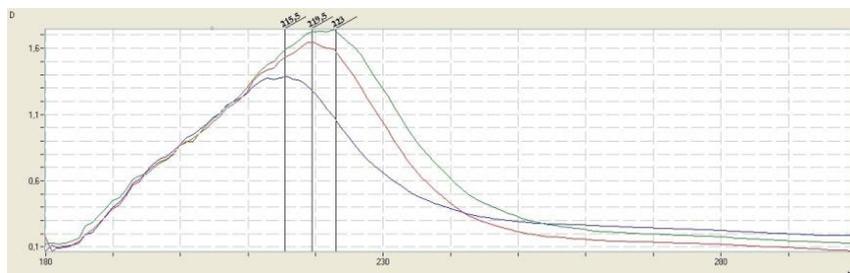


Рис. 1. Спектрофотометрия альгинатов натрия. Синим обозначен интактный образец, красным и зеленым — первый и второй модифицированные соответственно

Анализируя спектры модифицированных альгинатов натрия (рис. 1), мы видим батохромный сдвиг пика с 215,5 нм у интактного образца до 219,5 нм у первого и 223 нм у второго модифицированных, а также гиперхромный сдвиг с увеличением оптической плотности с 1,4 до 1,65 и 1,72 соответственно.

Дальнейший анализ выявил увеличение содержания карбонильных, карбоксильных и нитрогрупп в модифицированных альгинатах (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика полученных образцов модифицированных альгинатов натрия

Вид альгината	Объем модифицирующей смеси, мл	Содержание карбонильных групп, %	Содержание карбоксильных групп, %	Содержание нитрогрупп, %
Интактный	—	100	100	0
Модифицированный №1	10	130±12,84	116±2,24	3,82±0,08
Модифицированный №2	50	190±8,00	157±3,57	5,56±0,64

На рис. 2 представлены микрофотографии культуры человеческих фибробластов на гидрогелях ALG(2)G(3)TG, ALG(2)**mALG**₁(2)G(3)TG, ALG(2)**mALG**₂(2)G(3)TG на 7 день культивирования. Как видно, добавление в гидрогели модифицированных образцов альгината натрия существенно увеличивается количество клеток вытянутой морфологии и становится равномернее их распределение по поверхности гидрогелей.

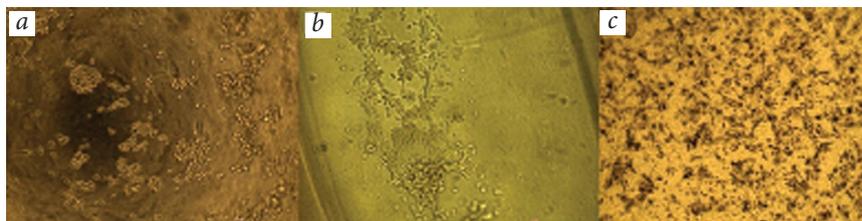


Рис. 2. Фазово-контрастная микроскопия гидрогелей на 7-й день культивирования. Увеличение 100X. *a* — гидрогель A(2)G(3)TG, *b* — A(2)**mALG**₁(2)G(3)TG, *c* — A(2)**mALG**₂(2)G(3)TG. Клетки гидрогеля ALG(2)**mALG**₂(2)G(3)TG контрастированы МТТ-реактивом из-за низкой прозрачности геля

Данные микроскопии подтверждаются результатами МТТ-теста, где мы видим увеличение метаболической активности фибробластов на 3 и 7 дни культивирования в модифицированных гидрогелях (рис. 3).

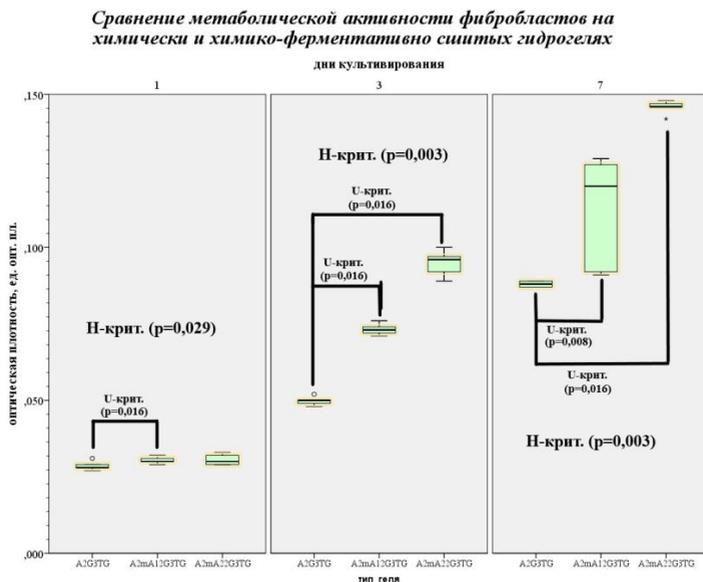


Рис. 3. Сравнение метаболической активности фибробластов на гидрогелях. Границы «ящиков» — межквартильные размахи, «усы» — минимальные и максимальные значения, горизонтальная линия — медиана, кружки и звездочки — выбросы и ошибки

Проблема создания биоинженерных скаффолдов является критически важной для медицины. В настоящее время в качестве сырья для получения биомедицинских изделий рассматривается множество полимеров, как природных, так и искусственных [3]. Тем более очевидно, что было предложено множество методов их модификации, например периодатное окисление альгината натрия [4–6].

Предложенный нами способ модификации альгината натрия пероксинитритом на данный момент уступает периодатному окислению по своей специфичности и воспроизводимости, но имеет свои преимущества: не требует дорогих реактивов, простота проведения

модификации альгината натрия и, самое главное, возможность внесения в полимер различных функциональных групп (как карбонильных, так и карбоксильных и нитрогрупп), что потенциально повышает реакционную способность вещества и адгезивность получаемых на его основе гидрогелей.

Полученные нами модифицированные образцы альгината натрия улучшают цитосовместимость и адгезивность гидрогелей. Важным является отсутствие цитотоксического действия у полученных в результате модификации гидрогелей.

Заключение. Таким образом, нами предложена методика модификации альгината натрия пероксинитритом, позволяющая внести в молекулу полимера карбонильные, карбоксильные и нитрогруппы. Полученные ионно-ферментно сшитые гидрогели на основе модифицированного альгината натрия и желатина проявляют удовлетворительные адгезивные свойства и не снижают метаболическую активность фибробластов на своей поверхности.

Список литературы

1. Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Антонова Л.В. и др. Влияние различных концентраций фибриногена на свойства фибриновой матрицы для тканевой сосудистой инженерии// Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2021. Т. 29, №1. С. 21-34. doi: 10.23888/PAVLOVJ202129121-34
2. Буев Д.О., Емелин А.М., Яковлев И.А. и др. Культивирование миобластов и миосателлитоцитов *in vitro*// Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2020. Т.8, №1. С. 86-97. doi:10.23888/HMJ20208186-97
3. Abdulghani S., Mitchell G.R. Biomaterials for in situ tissue regeneration: a review// Biomolecules. 2019. Vol. 9(11). P. 750. doi: 10.3390/biom9110750
4. Putri A., Picchioni F., Harjanto S. et al. Alginate Modification and Lectin-Conjugation Approach to Synthesize the Mucoadhesive Matrix// Applied Sciences. 2021. №11. P. 11818. doi: 10.3390/app112411818
5. Kong X., Chen L., Li B. et al. Applications of oxidized alginate in regenerative medicine// Journal of Materials Chemistry B. 2021. Vol. 9(12). P. 2785–2801. doi:10.1039/d0tb02691c
6. Rajalekshmi R., Kaladevi Shaji A., Joseph R. et al. Scaffold for liver tissue engineering: Exploring the potential of fibrin incorporated alginate dialdehyde-gelatin hydrogel// Int J Biol Macromol. 2021. №166. P. 999-1008. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.256

УДК 577.17

Зорина И.И., Захарова И.О., Шпаков А.О.
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург
zorina.inna.spb@gmail.com

ЭФФЕКТЫ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ИНСУЛИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КОРЕ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ГЛОБАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Интраназально вводимый инсулин может рассматриваться в качестве кандидатного лекарственного средства при церебральной ишемии, оказывая нейропротекторные и нейромодуляторные эффекты. Изучали его влияние на экспрессию генов про- и антиапоптотических белков Bax и Bcl-2, эндотелиальной и нейрональной форм NO-синтазы и ферментов антиоксидантной защиты в коре мозга крыс, перенесших двухсосудистую ишемию переднего мозга с последующей реперфузией.

Ключевые слова: интраназальный инсулин, церебральная ишемия, апоптоз, антиоксидантная защита.

Zorina I.I., Zakharova I.O., Shpakov A.O.
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry
Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg

EFFECTS OF INTRANASAL INSULIN ON GENE EXPRESSION IN RAT BRAIN CORTEX AFTER GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA

Intranasally administered insulin is considered as a candidate drug for cerebral ischemia, providing neuroprotective and neuromodulatory effects. We studied its effect on the gene expression of the pro- and anti-apoptotic proteins Bax and Bcl-2, endothelial and neuronal forms of NO-synthase and antioxidant defense enzymes in the cerebral cortex of rats after two-vessel forebrain ischemia followed by reperfusion.

Keywords: intranasal insulin, cerebral ischemia, apoptosis, antioxidant defense.

Введение. Огромная распространенность и социально-экономическая значимость острых нарушений мозгового кровообращения способствуют поиску терапевтических и лекарственных подходов для их профилактики, лечения и последующей реабилитации. Однако, несмотря на это в клинической практике отсутствуют эффектив-

ные нейропротекторы, позволяющие комплексно воздействовать на структуры головного мозга, предотвращать или снижать степень их повреждения при инсульте и других состояниях, вызывающих ишемию головного мозга [1].

Длительное время считалось, что мозг является нечувствительным к инсулину органом, и инсулин рассматривался исключительно в качестве периферического гормона, отвечающего за глюкозный гомеостаз. Но данные последних лет указывают на наличие инсулина и специфичных к нему инсулиновых рецепторов в нейронах и глиальных клетках головного мозга, которые активируются при взаимодействии с инсулином и запускают соответствующие сигнальные каскады, направленные на реализацию эффектов этого гормона в ЦНС [2]. Так, инсулин оказывает множественное действие и регулирует метаболизм и функции нейронов и клеток глии, нормализует обменные процессы при неблагоприятных воздействиях на мозг, влияет на синаптогенез и ангиогенез, проявляя тем самым нейротрофическое, нейромодуляторное и нейропротекторное действие [3].

В последние годы интерес исследователей направлен на изучение терапевтических возможностей интраназально вводимого инсулина (ИВИ), который при подобном способе доставки значимо не влияет на уровень глюкозы на периферии и позволяет оказывать выраженное положительное действие на головной мозг. В клинических испытаниях на людях ИВИ зарекомендовал себя как эффективный препарат, усиливающий когнитивные способности, при мягком когнитивном дефиците и болезни Альцгеймера [3]. Однако, исследования эффектов ИВИ при церебральной ишемии единичны. Данная работа направлена на изучение влияния ИВИ на содержание про- и антиапоптотических белков Вах и Vcl-2 и их экспрессию, экспрессию генов эндотелиальной и нейрональной форм NO-синтазы (eNOS, nNOS) и экспрессию генов ферментов антиоксидантной защиты в коре мозга крыс, перенесших глобальную двухсосудистую ишемию переднего мозга с последующей реперфузией (ИшР).

Материалы и методы. Для экспериментов использовали самцов крыс Wistar (250-300 г), содержащихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. При исследовании соблюдали требования European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC), «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и Этического комитета ИЭФБ РАН. Глобальная ишемия переднего мозга моделировалась путем окклюзии обеих каротидных артерий

на 20 минут с помощью сосудистых клипс в сочетании с гипотензией [4]. Животные вводились в наркоз с помощью хлоральгидрата в дозе 400 мг/кг веса. Гипотензия осуществлялась путем отбора крови из бедренной артерии в гепаринизированный шприц, а также перед отбором крови крысам вводили 0.2 мл 0.9% NaCl, содержащий гепарин 50 Ед/мл. Забор крови проводили до достижения давления в 50 мм рт. ст. Контроль артериального давления производили с использованием системы для неинвазивного измерения давления «Систола» (Москва, Россия). Реперфузия переднего мозга осуществлялась путем снятия сосудистых клипс с одновременным введением ранее отобранной в шприц крови в смеси с гепарином в кровяное русло и проводилась в течение 1 ч. Ложно-оперированные животные (ЛО) анестезировались, у них проводилось препарирование артерий, но не отбиралась кровь и не проводилось пережатие каротидных артерий.

Бычий инсулин («Sigma Aldrich», США), растворенный в цитратном буфере, рН 4.4, в количестве 0.5 МЕ вводили крысам интраназально за 1 ч до окклюзии. Группа ЛО интраназально получала эквивалентное количество растворителя также за 1 ч до окклюзии.

По окончании реперфузии выделяли кору головного мозга крыс, которую использовали для выделения РНК и дальнейшей оценки экспрессии генов и для определения количества белков методом Вестерн-блоттинга.

Оценку экспрессии генов методом количественной RT-ПЦР с обратной транскрипцией осуществляли в смеси, содержащей 10 нг кДНК, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров и qPCRmix-HS SYBR + LowROX («Евроген», Россия). Расчет уровня экспрессии целевого гена проводили по методу $\Delta\Delta CT$ и выражали в RQ, используя экспрессию гена 18S рРНК в качестве референса.

Для Вестерн-блоттинга проводили электрофоретическое разделение равного количества белка из каждой пробы в ПААГ по методу Лэммли, затем осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану и проводили инкубацию с первичными антителами — Anti-Bax (1:1000), Anti-Bcl-2 (1:1000), Anti-GAPDH (1:2000) («Cell Signaling Technology», США). Затем добавляли вторичные анти-кроличьи IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:1000, «Cell Signalling Technology», США). Сигнал вторичных антител усиливали с помощью набора для иммунохемилюминесценции (Novex ECL Western Blotting Detection Reagents, «Invitrogen», США), свечение фиксировали на фотопленке. Для нормализации данных мембра-

ны после стриппинга окрашивали с использованием Anti-GAPDH антител. Проявленные фото пленки визуализировали на сканере, а данные обрабатывали денситометрически. Данные выражали как отношение проапоптотического белка Вах к антиапоптотическому белку Bcl-2.

Статистический анализ проводили с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007» (США). Результаты представляли в виде средней \pm SEM. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Нами показано, что введение инсулина интраназально перед эпизодом ишемии может способствовать активации некоторых компонентов антиоксидантной системы. При ИшР происходит снижение экспрессии гена *CAT*, кодирующего экспрессию фермента каталазы, и гена *SOD1*, кодирующего цитоплазматическую форму супероксиддисмутазы (СОД), и наблюдается тенденция к снижению экспрессии гена митохондриальной формы СОД, *SOD2* (Табл. 1). ИВИ препятствует снижению экспрессии исследуемых генов, и при этом уровень экспрессии мРНК *SOD1* оказался выше, чем в группе ЛО. Инсулин известен своими антиоксидантными эффектами в ЦНС. Отмечено, что инсулин повышает уровень мочевой кислоты в ЦНС, которая выполняет функции антиоксиданта [5], и уровень глутатиона посредством регуляции работы ферментов системы глутатиона [6].

Таблица 1. Эффекты интраназального введения 0.5 МЕ инсулина на экспрессию генов в коре мозга у ложно-оперированных крыс и животных, подвергнутых двухсосудистой ишемии и реперфузии головного мозга

RQ, усл.ед.	NOS1	NOS3	SOD1	SOD2	CAT
ЛО	1,05 \pm 0,16	1,13 \pm 0,24	1,03 \pm 0,06	1,01 \pm 0,06	1,09 \pm 0,17
ИшР	0,73 \pm 0,12	2,50 \pm 0,3 *	0,68 \pm 0,14 *	0,85 \pm 0,07	0,57 \pm 0,11 *
ИшР-Инс	1,25 \pm 0,25#	2,55 \pm 0,6 *	1,39 \pm 0,22 #	1,20 \pm 0,13 #	1,12 \pm 0,19

Примечание. Данные представлены как средние \pm SEM из 6-7 опытов. ЛО — ложно-оперированные крысы, ИшР — крысы, подвергнутые двухсосудистой ишемии и реперфузии, ИшР-Инс — крысы, подвергнутые двухсосудистой ишемии и реперфузии и получавшие инсулин в дозе 0.5 МЕ/животное. * — по сравнению с ЛО, $p < 0.05$; # — по сравнению с ИшР, $p < 0.05$.

Инсулин рассматривают в качестве вазоактивного гормона, который способен повышать продукцию NO и экспрессию NO-синтазы в эндотелиальных клетках, что может положительно сказываться на регуляции микрососудистого русла в зоне ишемии [7]. Мы изучили экспрессию генов нейрональной и эндотелиальной форм NO-синтазы (*NOS1*, *NOS3*, соответственно) в коре мозга крыс, перенесших ИШР, и влияние на нее ИВИ (см. табл. 1). Показана активация генной экспрессии eNOS при ИШР. Уровень мРНК *NOS3* повышался в 2.5 раза по сравнению с группой ЛО, как и в группе животных, перенесших ИШР и получавших инсулин. Это, вероятно, связано с компенсаторным характером активации экспрессии гена *NOS3* в условиях церебральной ишемии. При этом нами отмечено увеличение экспрессии гена *NOS1*, кодирующего nNOS, в группе ИШР-Инс по сравнению с группой животных, перенесших ИШР, где была обнаружена тенденция к снижению экспрессии гена *NOS1* ($p=0.12$).

Защитный эффект инсулина в значительной степени зависит от его способности препятствовать гибели клеток и активации апоптоза. Мы исследовали влияние ИВИ на уровень экспрессии про- и антиапоптотических белков *Bax* и *Bcl-2* и на отношение количества белков *Bax/Bcl-2* (табл. 2). В коре мозга крыс, перенесших ИШР, наблюдали значительное уменьшение экспрессии исследуемых генов. ИВИ повышал экспрессию гена, кодирующего антиапоптотический белок *Bcl-2*, не влияя при этом на экспрессию гена *Bax* (табл. 2).

Методом Вестерн-блоттинга обнаружено повышение отношения *Bax/Bcl-2* в коре мозга крыс в 2.1 раза при ИШР (см. табл. 2), а ИВИ приводил к увеличению этого показателя до уровня в группе ЛО, что сходно с описанным нами ранее антиапоптотическим действием инсулина *in vitro* при индукции окислительного стресса на культуре кортикальных нейронов крысы [8]. Увеличение уровня антиапоптотического белка *Bcl-2* при введении инсулина может быть связано с активацией Akt-зависимого сигнального пути и фосфорилированием Akt-киназой транскрипционного фактора CREB, способного активировать экспрессию *Bcl-2* [9].

Таблица 2. Эффекты интраназального введения 0.5 МЕ инсулина на экспрессию генов про- и антиапоптотического белков Вах и Bcl-2 и их содержание в коре мозга у ложно-оперированных крыс и животных, подвергнутых двухсосудистой ишемии и реперфузии головного мозга

	RQ Вах, усл. ед.	RQ BCL-2, усл. ед.	Вах/Bcl-2
ЛО	1,01±0,06	1,03±0,11	0,033±0,009
ИшР	0,56±0,09*	0,54±0,06*	0,061±0,009*
ИшР-Инс	0,75±0,05*	1,08±0,16 #	0,037±0,01

Примечание. Данные представлены как средние±SEM из 6-7 опытов. ЛО — ложно-оперированные крысы, ИшР — крысы, подвергнутые двухсосудистой ишемии и реперфузии, ИшР-Инс — крысы, подвергнутые двухсосудистой ишемии и реперфузии и получавшие инсулин в дозе 0.5 МЕ/животное. * — по сравнению с ЛО, $p < 0,05$; # — по сравнению с ИшР, $p < 0,05$.

Нейропротекцию, обеспечиваемую инсулином, связывают с его влиянием на работу ионных транспортеров, с регуляцией работы митохондрий и апоптоза, со способностью подавлять окислительный стресс и с регуляцией работы нейромедиаторных систем, в частности глутаматной [10]. Проведенное исследование проливает свет на некоторые механизмы нейропротекторных эффектов инсулина при его интраназальном введении в условиях ИшР, что открывает перспективы для его изучения в качестве препарата для лечения ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-75-01083).

Список литературы

1. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных. Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых [Электронный ресурс] // Министерство здравоохранения Российской Федерации: [Официальный сайт]. 2021. URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/171_2 (дата обращения: 19.09.2023).
2. Duarte A.I., Moreira P.I., Oliveira C.R. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone // Journal of Aging Research. 2012. №2012. С. 384017.
3. Hallschmid M. Intranasal insulin // Journal of Neuroendocrinology. 2021. № 33 (4). С. e12934.

4. Raval A.P., Liu C., Hu B.R. Rat model of global cerebral ischemia: the two-vessel occlusion (2VO) model of forebrain ischemia // *Animal Models of Acute Neurological Injuries*. Humana Press. 2009. С. 77-86.
5. Sevanian A., Davies K. J., Hochstein P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1991. № 54(6). С. 1129S-1134S.
6. Duarte A. I., Santos M. S., Oliveira C. R. и др. Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons--involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses // *Free Radical Biology and Medicine*. 2005. № 39. С. 876-889.
7. Gao F., Gao E., Yue T.L. и др. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation // *Circulation*. 2002. № 105(12). С. 1497-1502.
8. Zakharova I.O., Sokolova T.V., Bayunova L.V. и др. The Protective Effect of Insulin on Rat Cortical Neurons in Oxidative Stress and Its Dependence on the Modulation of Akt, GSK-3beta, ERK1/2, and AMPK Activities // *International Journal of Molecular Science*. 2019. № 20(15). С. 3702.
9. Pugazhenth S., Nesterova A., Sable C. и др. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. № 275(15). С. 10761-10766.
10. Zorina I.I., Avrova N.F., Zakharova I.O. и др. Prospects for the Use of Intranasally Administered Insulin and Insulin-Like Growth Factor-1 in Cerebral Ischemia // *Biochemistry (Mosc)*. 2023. № 88(3). С. 374-391.

УДК 577.12:616.137.8/9-004.6

Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д.

Рязанский государственный медицинский университет

им. акад. И.П. Павлова,

Рязань

fiv8@yandex.ru

ОЦЕНКА СВЯЗИ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ L-СЕЛЕКТИНА И УРОВНЕМ NO-СИНТАЗ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРИФЕРИЧЕСКИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

В исследовании выявлено статистически значимое повышение концентрации молекулы межклеточной адгезии L-селектина и iNOS в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей по сравнению со здоровыми донорами. Кроме того, выявлена поло-

жительная корреляционная связь средней силы между концентрацией L-селектина и iNOS.

Ключевые слова: селектины, периферический атеросклероз, молекулы адгезии, адгезивная функция эндотелия.

*Korotkova N.V., Kalinin R.E., Suchkov I.A., Mzhavanadze N.D.
Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov,
Ryazan*

EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN CONCENTRATION OF L-SELECTIN AND THE LEVEL OF NO- SYNTHASES IN PATIENTS WITH PERIPHERAL ATHEROSCLEROSIS

The study revealed a statistically significant increase in the concentrations of the intercellular adhesion molecule L-selectin and iNOS in the blood serum of patients with atherosclerosis of the arteries of the lower extremities compared with healthy donors. In addition, a positive correlation of average strength between the concentration of L-selectin and iNOS was revealed.

Keywords: selectins, peripheral atherosclerosis, adhesion molecules, endothelial adhesive function.

Введение (актуальность). *L-селектин* является представителем семейства молекул клеточной адгезии, обеспечивающим адгезию клеток крови к эндотелиоцитам и между собой [1]. Он относится к гликопротеинам клеточных мембран и также, как и его близкородственные молекулы — *P-* и *E- селектины*, в своем составе содержит внеклеточные домены: N-концевой, кальций-зависимый; домен, подобный эпидермальному фактору роста (EGF), ответственный за распознавание углеводов; домены так называемых консенсусных повторов, которых в составе L-селектина 2; трансмембранный домен и короткий цитоплазматический домен [2].

Экспрессия L-селектина осуществляется лейкоцитами: нейтрофилами, Т- и В-лимфоцитами, моноцитами и макрофагами, дендритными клетками, а также НК-клетками; характер его экспрессии является конститутивным [3]. По мнению Hossain M. с соавторами оксид азота может оказывать влияние на экспрессию молекул клеточной адгезии, но механизмы такого влияния на сегодняшний день изучены недостаточно [4].

Периферический атеросклероз является системным заболеванием и довольно серьезной патологией, заболеваемость ею растёт по всему земному шару [5]. Он опасен своими осложнениями, такими,

как тромбоз и тромбоемболия; его течению и прогрессированию способствуют факторы риска, например, гипергликемия, гиперлипидемия, курение [6].

Цель. Провести количественную оценку L-селектина и NO-синтаз в сыворотке крови пациентов с периферическим атеросклерозом и установить взаимосвязи между ними.

Материалы и методы. Исследование одобрено на заседании ЛЭК Рязанского государственного медицинского университета 15.04.2020 (протокол № 9) и соответствует требованиям Надлежащей Клинической Практики (Good Clinical Practice, GCP), а также Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования».

Исследование было проведено на 2 группах пациентов. Одну из них составили пациенты с атеросклерозом артерий нижних конечностей (n=31), проходившие лечение в ГБУ РО «БСМП» и в ГБУ РО «ОКБ» в 2021–2023 гг. Вторую — клинически здоровые доноры, сопоставимые с испытуемыми по возрасту и полу (n=26). Материалом для исследования послужила сыворотка крови. Забор крови у пациентов и доноров проводился однократно из локтевой вены в утреннее время натощак. Кровь центрифугировали при ускорении 1000 g, продолжительность центрифугирования составила 20 минут.

Количественное определение селектина L и NO-синтаз в сыворотке крови проводили с использованием сэндвич-метода ИФА на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc. Palm City, FL 34990, USA). Результаты выражали в нг/мл.

Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с использованием программ Microsoft Office Excel 2016 и IBM SPSS Statistics 26 (StatSoftInc., США). Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Для подсчета статистической значимости различий непрерывных величин использовали U-критерий Манна–Уитни, данные представлены в формате M (min; max), где M — среднее значение, min — минимальное значение, max — максимальное значение. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. При определении концентрации L-селектина нами было отмечено его статистически значимое повышение в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей по сравнению с группой контроля (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация селектина L (нг/мл) и уровень NO синтаз (нг/мл) в периферической крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей, (M [min; max])

Группа	Концентрация L-селектина, нг/мл	Уровень iNOS, нг/мл	Уровень eNOS, нг/мл
Контрольная группа (n=26)	1469,3 [145,8; 4280,0]	0,55 [0,05; 5,54]	0,12 [0,01; 0,34]
Пациенты с атеросклерозом артерий нижних конечностей (n=31)	2320,8* [213,0; 4630,0]	2,95* [0,02; 16,28]	0,13 [0,02; 0,23]

*Примечание:** — статистически значимое отличие уровня NO-синтаз и L-селектина в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей по сравнению с группой контроля, $p \leq 0,05$.

При этом уровень NO-синтаз несколько отличался у исследуемых групп. Так, индуцибельная NO-синтаза (iNOS) демонстрировала статистически значимое повышение у пациентов с атеросклерозом по сравнению с контрольной группой. Тогда как уровень эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) находился в состоянии статистически не выраженной тенденции. Кроме того, была установлена положительная корреляционная связь средней силы между концентрацией L-селектина и уровнем индуцибельной NO-синтазы в сыворотке крови пациентов с периферическим атеросклерозом нижних конечностей ($r=0,5$).

Рекрутирование лейкоцитов в стенку артерии является одним из ключевых звеньев в патогенезе атеросклероза, в том числе периферического. В сосудистой стенке лейкоциты совместно с поступающими в неё липидами запускают множество воспалительных реакций, привлекая ещё большие количества лейкоцитов и способствуя всё большему распространению атеросклеротической бляшки. На сегодняшний день доказано участие в патогенезе атеросклероза клеток иммунной системы — макрофагов и лимфоцитов, а также нейтрофилов, дендритных клеток, натуральных киллеров [7]. Для нейтрофилов такая функция была открыта позже, чем для других лейкоцитов. Известно, что основная часть этих клеток находится в маргинальном пуле, но при возникновении угрозы повреждения происходит их перераспределение и количество в циркулирующем

пуле увеличивается [8]. Вполне вероятно, что это и является одной из причин повышения концентрации растворимого фрагмента sL-селектина в сыворотке крови пациентом с периферическим атеросклерозом, который в клинике и используется в качестве диагностического критерия нарушения адгезивной функции эндотелия [9]. Кроме того, статистически значимое повышение уровня iNOS и положительная корреляционная связь между изучаемыми показателями может свидетельствовать о возможной регуляции экспрессии *L-селектина* оксидом азота.

Выводы.

1. Концентрация *L-селектина* в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей повышена по сравнению со здоровыми донорами.

2. Концентрация индуцибельной *NO-синтазы* в сыворотке крови пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей повышена по сравнению со здоровыми донорами.

3. Обнаружена положительная корреляционная связь средней силы между концентрацией *L-селектина* и *iNOS*, что может предположительно указывать на регулирующее влияние оксида азота на экспрессию *L-селектина* и требует дальнейшего, более углубленного, изучения данной проблемы.

Список литературы

1. Tvaroška I., Selvaraj C., Koča J. Selectins — The Two Dr. Jekyll and Mr. Hyde Faces of Adhesion Molecules. A Review // *Molecules*. 2020. 25(12):2835. doi:10.3390/molecules25122835.

2. Kansas G.S. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies // *Blood* 1996. №88. P. 3259–3287.

3. Cummings R.D., Smith D.F. The selectin family of carbohydrate-binding proteins: structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion // *Bioessays*. 1992. №14(12). P. 849 — 856. doi: 10.1002/bies.950141210.

4. Hossain M., Qadri S.M., Liu L. Inhibition of nitric oxide synthesis enhances leukocyte rolling and adhesion in human microvasculature // *J. Inflamm. (Lond)*. 2012. 9(1):28. doi: 10.1186/1476-9255-9-28.

5. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Климентова Э.А., Егоров А.А., Карпов В.В. Биомаркеры апоптоза и пролиферации клеток в диагностике прогрессирования атеросклероза в различных сосудистых бассейнах // *Российский медико-биологический вестник им. ака-*

демика И.П. Павлова. 2022. Т. 30. №2. С.243 — 252. doi: 10.17816/PAVLOVJ88938.

6. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Климентова Э.А., Поваров В.О. Метаболиты оксида азота при развитии осложнений после открытых реконструктивных вмешательств у пациентов с периферическим атеросклерозом // Наука молодых (EruditioJuvenium). 2021. Том. 9. № 3. С. 407 — 414. doi: 10.23888/HMJ202193407-414.

7. Саранчина Ю.В., Дутова С.В., Килина О.Ю., Ханарин Н.В., Кулакова Т.С. Роль нейтрофилов в патогенезе атеросклероза // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2018;17(6). С. 110 — 116. doi: 10.15829/1728-8800-2018-6-110-116.

8. Nesterova IV, Kolesnikova NV, Chudilova GA et al. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1 // Russian Journal of Infection and Immunity. 2017. №7(3). С.219 — 230. doi:10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.

9. Johnston G.I., Cook R.G., McEver R.P. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: Sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation // Cell. 1989. 56(6). P. 1033—1044. doi: 10.1016/0092-8674(89)90636-3.

УДК 61.615

Краецкая О.Ф.

*Белорусский государственный медицинский университет,
Минск, Беларусь
kot-oksi@yandex.ru*

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ IN SILICO ИНГИБИТОРНЫХ СВОЙСТВ ПИОГЛИТАЗОНА В ОТНОШЕНИИ HDAC1 И HDAC2

В работе спрогнозированы с помощью программы молекулярного докинга ингибирующие свойства лекарственного средства пиоглитазона в отношении гистондеацилаз HDAC1 и HDAC2. Показано, что пиоглитазон проявляет хорошую аффинность in silico к гистондеацилазам HDAC1 и HDAC2 (Есв. = -5,86 и -3,72 ккал/моль соответственно), что позволяет спрогнозировать возможный противоопухолевый механизм действия пиоглитазона в качестве их ингибитора in vitro.

Ключевые слова: пиоглитазон, ингибиторы гистондеацилаз, in silico, молекулярный докинг.

Kraetskaya O.F.
Belarusian State Medical University,
Minsk, Belarus

PREDICTION IN SILICO OF THE INHIBITORY PROPERTIES OF PIOGLITAZONE AGAINST HDAC1 AND HDAC2

In this paper, the inhibitory properties of the drug pioglitazone against histone deacylases HDAC1 and HDAC2 were predicted using a molecular docking program. It has been shown that pioglitazone exhibits good affinity in silico to histone deacylases HDAC1 and HDAC2 (Esp. = -5.86 and -3.72 kcal/mol, respectively), which makes it possible to predict a possible antitumor mechanism of action of pioglitazone as their inhibitor in vitro.

Keywords: *pioglitazone, histone deacylase inhibitors, in silico, molecular docking.*

В настоящее время пиоглитазон — единственный представитель группы сахароснижающих препаратов — тиазолидиндионов (глитазонов). Эти препараты являются агонистами ядерных γ -рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR γ), который экспрессируется преимущественно в жировой ткани и вызывает транскрипцию генов, принимающих участие в метаболизме глюкозы и липидов. В адипоцитах активация PPAR γ снижает уровни воспалительных цитокинов и свободных жирных кислот и увеличивает концентрацию адипонектина, таким образом способствуя повышению чувствительности к инсулину и снижению уровня глюкозы [1].

Из литературных данных [2, 3] также известно, что производные пиоглитазона проявляют широкий спектр противоопухолевой активности с различными молекулярными механизмами действия. Один из таких молекулярных механизмов действия изучался нами в более ранних работах [4]. Тогда нам удалось спрогнозировать противоопухолевые свойства пиоглитазона и его производных как ингибиторов VEGF-A — фактора роста эндотелия кровеносных сосудов, приводящего к увеличению сосудистой проницаемости опухолей.

Однако также известно [5], что при различных видах онкологических заболеваний может наблюдаться повышенная экспрессия индивидуальных HDAC (гистондеацилаз) — ферментов, действующих в качестве ингибиторов экспрессии различных генов, в том числе и противоопухолевого фактора, что однозначно повышает риск развития опухоли. Так, например, уровень изоформы HDAC1 повышается при раке простаты, желудка, толстого кишечника, раке груди,

а HDAC2 — при колоректальном раке, раке груди и шейки матки [5]. Разработка ингибиторов HDAC — достаточно интересный и перспективный подход в лечении онкологических заболеваний. На настоящий момент существует ряд ингибиторов гистондеацетилаз [5, 6], начиная со сложных соединений, выделенных из бактерий и грибов (ТСА, тапоксин), и кончая относительно простыми соединениями (бутират), которые широко используются в онкологии [6]. На основании изложенного и в продолжении изучения возможных механизмов противоопухолевой активности пиоглитазона была рассмотрена возможность ингибирования им двух наиболее изученных на сегодняшний день гистондиацетилаз — HDAC1 и HDAC2.

Цель исследования: спрогнозировать с помощью программы молекулярного докинга возможность сродства пиоглитазона к различным видам гистондеацетилаз — HDAC1 и HDAC2.

Методы исследования: Выбор белков HDAC1 и HDAC2 проведён из банка данных 3D- структурных белков RSCB PDB. 3D-модель пиоглитазола создана с помощью специализированных программ пакета Chemoffice. Молекулярный докинг осуществлен с помощью программы Docking server с использованием полуэмпирического метода расчетов квантовой химии PM6, метода геометрической оптимизации MMFF94 при значении рН 7.0, количество пробегов — 20.

Взаимодействие лиганда и белка (аффинность) оценивалось при помощи характеристик, полученных в результате докинга: энергии связывания и константы ингибирования. В настоящей работе энергией связывания считали наименьшее значение изменения свободной энергии Гиббса при переходе комплекса лиганд-протеин из несвязанного состояния в связанное.

Результаты исследования. Был проведен молекулярный докинг пиоглитазона с ферментами HDAC1 и HDAC2.

Более низкое значение свободной энергии связывания для лиганда (пиоглитазона) должно свидетельствовать о его более высокой аффинности к анализируемым белкам-гистондеацетилазам.

Определено, что достаточно хорошую аффинность пиоглитазон проявляет в отношении гистондеацетилазы HDAC1. В отношении HDAC2 аналогичные параметры связывания для пиоглитазона оказались близки, но все-таки немного уступали таковым для HDAC1 (таблица).

Также с помощью молекулярного докинга был изучен аминокислотный состав аллостерического центра связывания пиоглитазона с HDAC1 и HDAC2 (рис.). Нужно отметить, что отличия присутство-

вали и по аминокислотному составу аллостерического центра связывания, однако, в обоих случаях большую долю в процесс связывания с пиоглитазоном вносили гидрофильные фрагменты (отмечены зеленым цветом) белковых молекул.

Таблица. Результаты молекулярного докинга пиоглитазона с HDAC1 и HDAC2

Изоформа гистондеацетилазы	Энергия связывания, ккал/моль
HDAC1	-5,86
HDAC2	-3,72

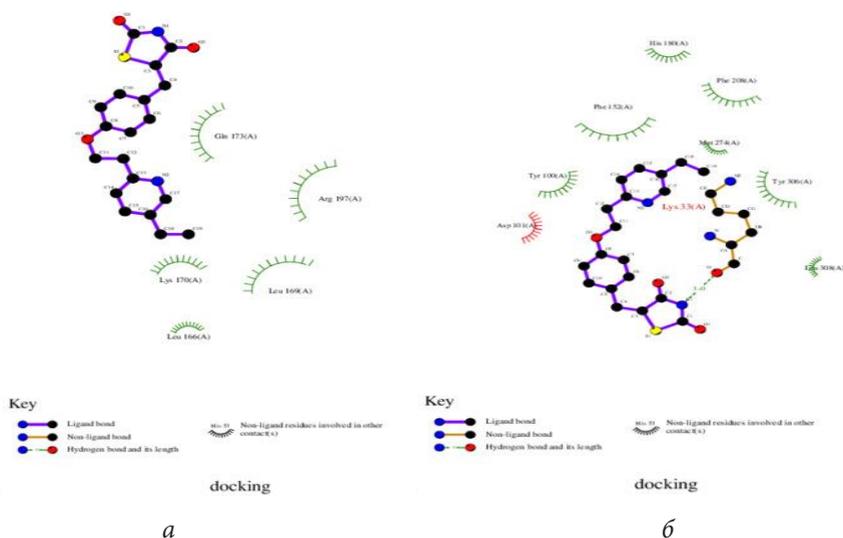


Рисунок. *а* — Аллостерический центр связывания пиоглитазона с HDAC1; *б* — аллостерический центр связывания пиоглитазона с HDAC2

Вывод. Пиоглитазон проявляет хорошую аффинность *in silico* к гистондеацетилазам HDAC1 и HDAC2, что позволяет спрогнозировать возможный противоопухолевый механизм действия пиоглитазона в качестве их ингибитора *in vitro*.

Список литературы

1. Console A. Do thiazolidinediones play a role in the treatment of type 2 diabetes mellitus? / A. Console, G. Formoso // Diabetes Obesity Metab. 2013, № 15. P. 967–977.
2. Filipova Pioglitazone and the Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis / E. Filipova, K. Uzunova, K. Kalinov // Diabetes Ther. 2017, №8. P. 705-726.
3. Rahid M. Synthesis and sar strategy of thiazolidinedione: a novel approach for cancer treatment / M. Rashid, N. Shrivastava, A. Husain // J. Chil. Chem. Soc. –2020, 65, N. 2. — P. 4819–4832.
4. Краецкая О.Ф. Моделирование новых производных пиоглитазона и изучение зависимости структура-биологическая активность in silico на основе рецептора VEGF. / О.Ф. Краецкая // Материалы Всеросс. науч.-практ. конф-ции: «Инновационные технологии в фармации», ИГМУ. 2022. С. 54-60.
5. Barneda-Zahonero B., Parra M. Histone deacetylases and cancer. Barneda-Zahonero // Mol Oncol. 2012, №6. —P. 579-589.
6. Zhao L.M., Zhang J.H. Histone Deacetylase Inhibitors in Tumor Immunotherapy // Curr Med Chem. 2019, 26(17). P. 2990-3008.

УДК 612.392.98

*Кутузова Е. Г., Хабибрахманов А. И.
ФГБОУ ВО «Казанский государственный
медицинский университет» Минздрава России,
Казань
katysha-kutuzova@mail.ru; azathabibi@mail.ru*

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ ОЖИРЕНИЯ

Распространенность ожирения во всем мире в последние десятилетия достигает масштабов эпидемии. За последние четыре десятилетия количество людей, страдающих ожирением, выросло практически в четыре раза, при этом почти 45% мирового населения имеют избыточный вес. В данном исследовании разбираются механизмы развития ожирения и предлагаются рекомендации по профилактике и лечению.

Ключевые слова: *ожирение, патогенез, профилактика, лечение.*

*Kutuzova E. G., Khabibrakhmanov A. I.
Kazan State Medical University,
Kazan*

BIOCHEMICAL BASIS OF OBESITY DEVELOPMENT

The prevalence of obesity worldwide in recent decades has reached epidemic proportions. Over the past four decades, the number of obese people has almost quadrupled, with almost 45% of the world's population being overweight. This study examines the mechanisms of obesity development and offers recommendations for prevention and treatment.

Keywords: *obesity, pathogenesis, prevention, treatment.*

Избыточный вес или ожирение определяется как непропорциональная масса тела относительно роста и обычно рассчитывается с использованием индекса массы тела (ИМТ) (масса тела (кг)/рост² (м)), хотя эта мера признана неточной. Классификация ВОЗ определяет нормальные значения ИМТ как 18,5–24,9 кг/м²; избыточный вес — 25–29,9 кг/м² и ожирение — ≥ 30 кг/м².

Масса тела и, следовательно, ожирение определяются сложным взаимодействием потребления и расхода энергии, психосоциальными факторами, генетическими факторами, а также совместной деятельностью нервной и эндокринной систем организма. Поскольку эти аспекты широко рассматривались в других источниках, в этом исследовании основное внимание уделяется биохимической основе накопления жира в адипоцитах и патологических изменений при ожирении.

В частности, считается, что употребление избыточного количества липидов является инициатором ожирения [1]. Установлено также, что ожирение связано с увеличением концентрации в сыворотке крови некоторых аминокислот и характером белкового содержания рациона. Аминокислота цистеин, содержащая серу, связана с увеличением метаболических триглицеридов. Было показано, что не все серосодержащие аминокислоты вызывают этот эффект, и причина этих наблюдений не установлена [2]. Описанные выше наблюдения привели к биомедицинским гипотезам ожирения, основанным на выработке энергии посредством гидролизного превращения АТФ в АДФ и связанных с этим химических реакций.

Адипоциты играют важную роль как в хранении энергии, так и в качестве эндокринных клеток (т.е. они способны секретировать гор-

моны и другие факторы). Ожирение у людей приводит к увеличению размера, количества адипоцитов. Основными соединениями в этих клетках являются триглицериды плюс некоторое количество холестерина, различные белки и некоторые моно- и дикарбоновые жирные кислоты. Таким образом, развитие ожирения в результате повышения концентрации триглицеридов в клетках адипоцитов связано с накоплением этих метаболитов. Наблюдения показывают, что триглицериды не всасываются из пищеварительной системы, а гидролизуются в последней с образованием моно- и дикарбоновых кислот жирных кислот, моноглицеридов и глицерина. Предполагается также, что триглицериды образуются в результате метаболизма из вышеуказанных соединений, а также в процессе липогенеза. Считается, что этот процесс приводит к превращению углеводов, превышающих непосредственные метаболические потребности, в триглицериды. Образовавшиеся триглицериды поступают в хранилище преимущественно в адипоцитах. Наблюдение за последствиями лишения питания наряду с рядом биохимических исследований приводит к выводу, что биохимические реакции с участием этих накопленных триглицеридов и других липидов являются источником метаболической энергии. Определенные соединения появляются в моче людей, находящихся в условиях недостаточного питания. Эти соединения представляют собой бета-гидроксимасляную кислоту, ацетоуксусную кислоту и ацетон и называются кетоновыми телами. Считается, что происхождение соединений связано с химическими реакциями, в ходе которых триглицериды обеспечивают энергию для обмена веществ. В выработке энергии посредством мышечной активности участвует моносахарид глюкозы. Это соединение и другие метаболические моносахариды получают путем гидролиза потребляемых углеводов и переработки соединений, связанных со структурой мышц, таких как анилин, лактат и глицерин, через циклы Кори и Фелига. Процесс переработки называется глюконеогенезом. Эта концепция подразумевает, что против развития ожирения эффективна анаболическая нагрузка.

Большое анаболическое влияние, направленное против ожирения, оказывает физическая нагрузка, в условиях гипоксии, так как недостаток кислорода приводит к усилению синтеза белка в организме человека [3]. Кроме того, в качестве профилактики можно рекомендовать прием, так называемых, анаболических аминокислот — лейцина, валина, изолейцина. Возможна также заместитель-

ная гормональная терапия при наличии медицинских показаний для этого. Таким образом, в целях разработки таргетных подходов к решению проблемы ожирения, необходимо уделять внимание исследованиям, направленным на изучение биохимических основ этого патологического процесса.

Список литературы

1. Robertson D.S. The biochemical basis of obesity, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, Vol. 3, Issue 1, 2013, Pages 83-90, ISSN 2210-5239, <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.10.010>.
2. Bray G.A., Lovejoy J.C., Smith S.R., DeLany J.P., Lefevre M., Hwang D., Ryan D.H., York D.A. The Influence of Different Fats and Fatty Acids on Obesity, Insulin Resistance and Inflammation, *The Journal of Nutrition*, Vol. 132, Issue 9, 2002, Pages 2488-2491, ISSN 0022-3166, <https://doi.org/10.1093/jn/132.9.2488>.
3. Gamboa J.L., Garcia-Cazarin M.L., Andrade F.H. Chronic hypoxia increases insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.-2011.-V.300.-P. R85-R91.

УДК 615.03

*Муста Оглы Н.М.¹, Жилинская Н.Т.², Бландов А.Н.³,
Чуглова К.П.⁴*

^{1,2,3,4}Санкт-Петербургский медико-социальный институт

²ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова

*²Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого*

¹Nargul_m@mail.ru; ²jilinskie@mail.ru;

³blandov.2015@yandex.ru;

⁴klavazvezda@mail.ru

ВЫСОКОАКТИВНАЯ АНТИРЕТРОВИРУСНАЯ ТЕРАПИЯ

ВААРТ — метод терапии ВИЧ-инфекции, состоящий в регулярном приёме двух и более противовирусных препаратов. Благодаря приёму такой терапии ВИЧ-положительные люди могут вести нормальный образ жизни, а также не способны передать вирус другим людям половым путем и при рождении ребенка ВИЧ-инфицированной матерью.

Ключевые слова: ВААРТ, ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы протеазы и интегразы.

*Musta Ogly N.M.¹, Zhilinskaya N.T.²,
Blandov A.N.³, Chuglova K.P.⁴*

^{1,2,3,4}St. Petersburg Medical and Social Institute

*²Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center
of Oncology named after N.N. Petrov*

²Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY

HAART is a method of treating HIV infection, which consists of regularly taking two or more antiviral drugs. Thanks to this therapy, HIV-positive people can lead a normal life, and are also not able to transmit the virus to other people through sexual contact or when a child is born to an HIV-infected mother.

***Keywords:** HAART, reverse transcriptase inhibitors, protease and integrase inhibitors.*

Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) — метод терапии ВИЧ-инфекции, состоящий в регулярном приеме двух и более противовирусных препаратов. Основная цель терапии состоит в том, чтобы остановить воспроизведение вируса в организме. Когда вирусная нагрузка резко снижается, организм получает возможность постепенно восстановить количество CD4-лимфоцитов и, соответственно, адекватный иммунный ответ[1]. Основой ВААРТ является метод применения нескольких препаратов одновременно для подавления различных стадий развития вируса. До разработки тритерапии использовался лишь один препарат (первоначально это был зидовудин, широко используемый с 1987 года), к которому вирус быстро приспосабливался вследствие его высокой мутагенности. Первые ингибиторы протеазы и нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы были созданы в начале 1990-х годов и тогда же начали широко применяться. Применение трех препаратов позволяет эффективно подавлять не только имеющуюся в организме разновидность вируса, но и мутантные формы, появляющиеся во время болезни[2]. Комбинация препаратов собирается из двух, трех или четырех компонентов.

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы конкурентно подавляют фермент ВИЧ, который обеспечивает создание ДНК на основе РНК вируса. Эти препараты являются аналогами

нуклеозидов, отличаясь от них лишь небольшим изменением в молекуле рибозы. Встраивание их в синтезирующуюся цепь ДНК приводит к прекращению её синтеза из-за неспособности этого соединения образовывать фосфодиэфирную связь. К препаратам этой группы относятся зидовудин (азидотимидин, ретровир), ламивудин (эпивир), диданозин (видекс), ставудин (зерит), абакавир (зиаген).

Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ неконкурентно угнетают РНК-зависимую ДНК-полимеразу вируса за счет прямого взаимодействия с каталитическим центром фермента. К ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы относятся невирапин, делавирдин, этравирин и рилпивирин[3].

Ингибиторы протеазы блокируют фермент протеазу вируса, который расщепляет полипротеины Gag-Pol на отдельные белки, необходимые для нормального созревания вирусных частиц. Блокирование протеазы приводит к формированию неактивных вирусных частиц. Сюда относятся: ритонавир, индинавир (криксиван), комбинация лопинавир/ритонавир, атазанавир.

Ингибиторы интегразы блокируют фермент вируса, участвующий во встраивании вирусной ДНК в геном клетки-мишени с образованием провируса. Препаратами из группы ингибиторов интеграз являются: ралтегравир (исентресс), долутегравир (триумек), элвитегравир (витекта), биктегравир (биктарви).

Ингибиторы рецепторов CD-4 на Т-лимфоцитах-хелперах препятствуют проникновению ВИЧ в клетку-мишень, воздействуя на корцепторы CXCR4 и CCR5. Препарат этого класса, доступный для лечения — маравирик (целзентри). Препаратом этой группы также является ибализумаб (трогарзо).

Ингибиторы слияния: Ингибиторы слияния с мембраной клетки (фузии) блокируют последний этап проникновения ВИЧ в клетку-мишень. Примеры препаратов этой группы: энфувиртид (фузеон), фостемсавир (рукобия) [4].

Выводы. На сегодняшний день имеющиеся комбинации средств позволяют пациентам, инфицированными ВИЧ, жить неограниченно долго. Благодаря приему ВААРТ-терапии ВИЧ-положительные люди могут вести нормальный образ жизни, а также не способны передать вирус другим людям половым путем и при рождении ребенка ВИЧ-инфицированной матерью.

Список литературы

1. ВОЗ | Антиретровирусная терапия для лечения и профилактики ВИЧ // WHO. Дата обращ.: 19.12. 2020. Архив. 15.07.2020.
2. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents, Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents Архивная копия от 4 декабря 2016 на Wayback Machine. // US Department of Health and Human Services. Обновлено в апреле 2015 г.
3. Guure, Chris & Laryea, Sharren & Dery, Samuel & Silva, Carlota & Asamoah-Adu, Comfort & Ayisi-Addo, Stephen & Ane, Maria-Goretti & Mohammed, Adamu & Torpey, Kwasi. (2022). Behavioural Risk for HIV, Hepatitis B, and Hepatitis C Infections among a Population of Drug Users and Injectors across Four Regions in Ghana // Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2022. 1-12. 10.1155/2022/2544481.
4. CONSENSUS STATEMENT | United States | Prevention Access Campaign (англ.). U=U | United States | Prevention Access Campaign. Дата обращ.: 8.06.2019. Архив. 11.04.2020.

УДК 635.432

Муста Оглы Н.М.¹, Жилинская Н.Т.², Бландов А.Н.³

^{1,2,3}Санкт-Петербургский медико-социальный институт

²ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова

²Санкт-Петербургский политехнический университет

Петра Великого

¹Nargul_m@mail.ru; ²jilinskie@mail.ru; ³blandov.2015@yandex.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ МОРКОВИ *DAUCUS CAROTA L.*

*В работе при проведении сравнительного анализа выявлено, что стимулятор роста Корневин, добавленный в питательную среду А, проявил, по сравнению со стимулятором роста Green Belt, более выраженную степень влияния на пролиферативную активности каллусных клеток корнеплодов моркови *Daucus carota L.* в условиях дневного комнатного освещения и в условиях темноты.*

Ключевые слова: *каллусные клетки корнеплодов моркови, питательные среды, пролиферация клеток.*

Musta Ogly N.M.¹, Zhilinskaya N.T.², Blandov A.N.³

^{1,2,3}St. Petersburg Medical and Social Institute

*²Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of
Oncology named after N.N. Petrov*

³Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECT OF PLANT GROWTH
STIMULANTS ON THE CULTIVATION
OF CALLUS CELLS OF CARROT ROOTS
*DAUCUS CAROTA L.***

*In the work, when carrying out a comparative analysis, it was revealed that the growth stimulator Kornevin, added to the nutrient medium A, showed, in comparison with the growth stimulator Green Belt, a more pronounced degree of influence on the proliferative activity of callus cells of carrot roots *Daucus carota L.* in conditions of daytime indoor lighting and in dark conditions.*

Keywords: *carrot root callus cells, nutrient media, cell proliferation.*

Для усиления питания растений, используемых как в сельском хозяйстве, так и в фармацевтической индустрии, используют различные коммерческие стимуляторы роста подземных и наземных частей культур. Их действие основано на регуляции работы фитогормонов, вырабатываемых самим растением [1]. Традиционно для выращивания растительной культуры клеток или цельных растений в лабораториях используют питательную среду Мура-сиге–Скуга [2]. Состав среды: макроэлементы (NH_4NO_3 , CaCl_2 , MgSO_4 , K_2HPO_4 , KNO_3); микроэлементы (H_3BO_3 , CoCl_2 , CuSO_4 , MnSO_4 , KI , Na_2MoO_4 , ZnSO_4 ; раствор хелатного железа (натрий-железная соль этиледиаминтетрауксусной кислоты); мио-инозитол (В8), витамин РР, витамин В₆, витамин В₁, глицин, лактальбумин. Многокомпонентный состав среды объясняет ее высокую стоимость на рынке растениеводческой и биотехнологической продукции.

Актуальность: поиск новых биотехнологических методов контроля и оценки степени влияния коммерческих образцов стимуляторов роста растений на пролиферативную активность каллусных клеток и тканей.

Цель исследования: провести сравнительный анализ влияния питательных сред разработанного состава с использованием двух различных видов стимуляторов роста растений на пролиферативную активность каллусных клеток корнеплодов моркови *Daucus carota L.*

Объекты исследования: корнеплоды моркови, каллусные ткани, питательные среды для культивирования каллусной ткани.

Материалы и реактивы: нож, стерильные инструменты (скальпель, пинцет), стерильные чашки Петри; стерильные питательные среды.

Питательная среда А:

- 1) сахароза; агар-агар;
- 2) витамин В₆;
- 3) **Корневин** — стимулятор корнеобразования (фитогормон гетероауксин). Производитель ООО «Агросинтез». Химический состав: 4-(индол-3-ил) масляная кислота 5 г/кг;
- 4) Рэгги, ВРК — регулятор роста растений, гербицид. Производитель АО Фирмы «Август». Химический состав: хлормекват-хлорида 750 г/л.

Питательная среда В:

- 1) сахароза;
- 2) агар-агар;
- 3) витамин В₆;
- 4) **Green Belt** (корнерост) — стимулятор роста корней, обогащен янтарной кислотой, пестицид, используемые для борьбы с вредителями и внешними паразитами растений]. Производитель ООО «ПСК Техноэкспорт». Химический состав: 4-(индол-3-ил) масляная кислота 5 г/кг, янтарная кислота, хитозан;
- 5) Рэгги, ВРК — регулятор рост растений, гербицид. Производитель АО Фирмы «Август». Химический состав: хлормек-ват-хлорида 750 г/л.

Контрольная питательная среда:

- 1) сахароза;
- 2) агар-агар;
- 3) витамин В₆.

Компоненты стимуляции и регулирования роста, гербициды отсутствуют.

Методы исследований. *Получение экспланта корнеплода моркови* [3].

Отбирают здоровые корнеплоды моркови. Корнеплод моркови тщательно вымыть в мыльной воде и промыть в проточной (водопроводной) воде или погрузить на 15 мин в 6% раствор хлорамина или гипохлорита кальция. Можно погрузить для стерилизации в 96%

этиловый спирт на 5 минут без дальнейшего промывания стерильной водой. Затем удалить все остатки вещества с корнеплода путем промывания в 3 порциях стерильной дистиллированной воды (по 5 мин в каждой). В стерильных условиях отрезают 3 см верхней части корнеплода моркови и с помощью ножа очищают цилиндр из средней части корнеплода. Эксплант корнеплода моркови должен содержать ксилему, флоэму, паренхиму и камбий. Отделить среднюю часть корнеплода, разрезать на диски толщиной 5–7 мм, затем простерилизовать каждый диск, в растворе пероксида водорода в течение 5 мин и затем в дистиллированной воде. После каждый из дисков разделить на 10 сегментов и из каждого вычленивать сердцевинную паренхиму. Далее с помощью стерильного пинцета их переносят на питательную среду (рН 5,7–5,8).

Получение каллусной ткани из эксплантов корнеплодов моркови. Изолированные цилиндры корнеплодов моркови помещают в стерильную чашку Петри и разрезают на диски шириной 1–2 мм, на которых затем делают надсечки. Далее с помощью стерильного пинцета их переносят на стерильную питательную среду (рН 5,7–5,8), разлитую в стерильные чашки Петри.

Культивируют при дневном комнатном освещении или в темноте, температура культивирования +25+27°C. Взвешивание чашек Петри с питательной средой и пассированными клетками ткани из корнеплодов моркови производят через: 0 дней, 7, 14 и 21 день от начала пассирования.

Обработка результатов.

1. Через 1, 2 и 3 недели характеризуют и зарисовывают (фотографируют) сформировавшуюся каллусную ткань.

Результаты эксперимента оценивают по следующим показателям: интенсивность (частота) каллусообразования, т.е. подсчитают количество полученных каллусов в динамике и определяют прирост сырой биомассы каллусной ткани. Для этого через 7, 14 и 21 день от начала пассирования каллусы взвешивают на лабораторных весах. Прирост каллусной ткани вычисляют по формуле:

$$P_{кт} = (W_1 - W_0) / W_0$$

где $P_{кт}$ — прирост каллусной ткани; W_1 — конечный вес каллуса, W_0 — начальный вес каллуса.

Растущие каллусные культуры описывают по морфологическим признакам: наличие (отсутствие) каллусных клеток и тканей, на-

личие (отсутствие) признаков некроза каллусных клеток и тканей, наличие (отсутствие) признаков микробной контаминации на каллусных клетках и тканях.

Обозначение исследуемых проб:

1а, 2а — каллусные ткани, выращенные на питательной среде А в темноте.

2а, 2б — каллусные ткани, выращенные на питательной среде Б в темноте.

3а, 3б — каллусные ткани, выращенные на питательной среде А при дневном комнатном освещении.

4а, 4б — каллусные ткани, выращенные на питательной среде Б при дневном комнатном освещении.

Результаты исследований и их обсуждение.

Морфологическая картина роста каллусных клеток и тканей корнеплодов моркови *Daucus carota* L. представлена на рис. 1–4.

Каллусные культуры имеют рыхлую консистенцию, каллусные клетки — от белого до кремово-желтого цвета. Изменения массы

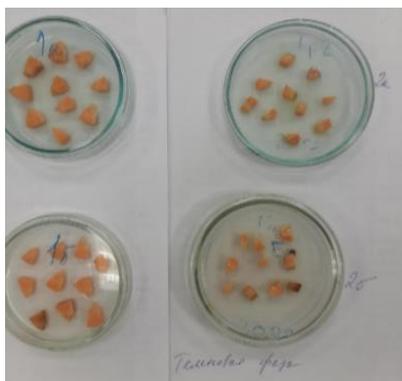


Рис. 1. Морфологическая картина культивирования клеток корнеплодов моркови, выращенных на питательных средах А и Б, в условиях отсутствия освещения (темнота). Пробы 1а, 1б, 2а, 2б. 14-е сутки культивирования

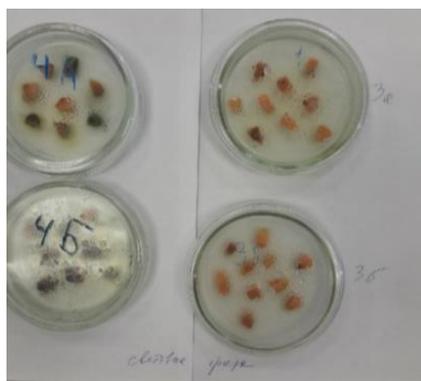


Рис. 2. Морфологическая картина культивирования клеток корнеплодов моркови, выращенных на питательных средах А и Б, в условиях дневного комнатного освещения. Пробы 3а, 3б, 4а, 4б. 14-е сутки культивирования

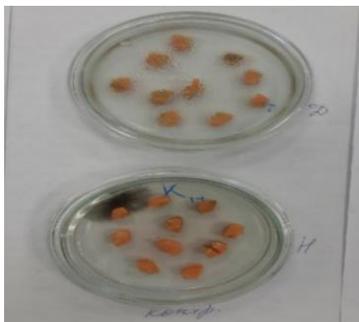


Рис. 3. Морфологическая картина культивирования клеток корнеплодов моркови, выращенных на контрольной питательной среде, в условиях дневного комнатного освещения (проба Д) и темноты (проба Н). 14-е сутки культивирования

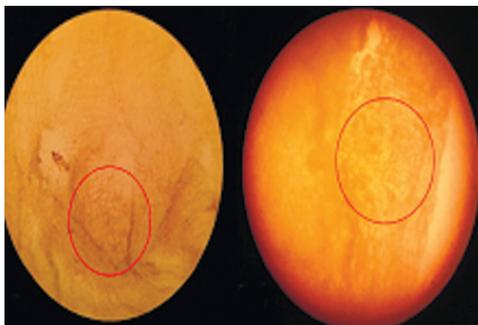


Рис. 4. Каллусная ткань корнеплодов моркови, выращенной на питательной среде А при дневном комнатном освещении. 14-е сутки культивирования. Препарат нативный, неокрашенный.
Ув.: об $\times 25$, ок $\times 10$

культуры каллусной ткани моркови в процессе культивирования представлены в табл. 1.

Таблица 1. Динамика измерения массы (г) культуры каллусной ткани моркови *Daucus carota* L.

№, п/п	0 неделя	1 неделя (7 дней культивирования)	2 неделя (14 дней культивирования)
<i>Темная фаза (выращивание в условиях темноты)</i>			
1а	140,27	137,77	134,50
1б	114,79	112,91	110,12
2а	133,23	130,19	125,90
2б	233,74	231,76	228,91
<i>Световая фаза (выращивание при дневном комнатном освещении)</i>			
3а	258,65	256,45	254,26
3б	233,12	231,35	229,31
4а	222,65	221,00	219,81
4б	253,72	252,65	250,37

Вывод. Уменьшение веса чашек Петри, в которых содержится питательная среда и исследуемый материал, связано, вероятно, с высыханием или испарением питательной среды.

Морфологическая оценка роста каллусной ткани корнеплодов моркови *Daucus carota L.* на 14-е сутки культивирования на различных питательных средах представлена в табл. 2.

Таблица 2. Результаты культивирования каллусной ткани

№, п/п	Признаки каллуса	Признаки некроза ткани	Признаки микробной контаминации	Выводы
<i>Темная фаза (выращивание в условиях темноты)</i>				
1а	+ (5)	+ (1)	+ (1)	Присутствуют все признаки
1б	+ (3–4)	+ (2)	–	Нет признаков микробной контаминации
2а	–	–	+	Нет признаков каллуса и некроза ткани, присутствует плесень
2б	+ (1)	+ (4)	+ (4)	Присутствуют все признаки
Кт	+ (2)	+ (4)	+ (1)	Присутствуют все признаки
<i>Световая фаза (выращивание при дневном комнатном освещении)</i>				
3а	+ (4–5)	+ (1)	–	Нет признаков микробной контаминации
3б	+ (4)	+ (1)	–	Нет признаков микробной контаминации
4а	+ (1)	+ (3)	+ (7)	Присутствуют все признаки
4б	–	+ (4)	+ (8)	Нет признаков каллусной ткани
Кс	+ (1)	–	–	Присутствуют признаки каллусной ткани

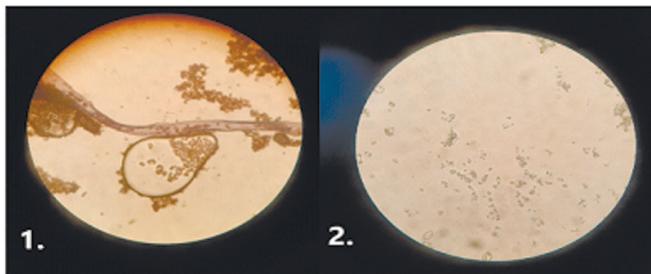


Рис. 5. Микробная контаминация калусных клеток и тканей корнеплодов моркови, выращенной на питательной среде Б при дневном комнатном освещении: 1 — *Aspergillus niger*; 2 — *Penicillium*. 14-е сутки культивирования. Препарат нативный, «раздавленная капля», неокрашенный.
Ув.: об $\times 40$, ок $\times 40$

Анализ полученных результатов показал, что в условиях комнатного дневного освещения рост калусной ткани происходил значительно интенсивнее и более выражено по сравнению с ростом каллуса в условиях темноты. Полученные данные согласуются с результатами исследований этапов преобразования клеточной системы растений в ответ на действие света [4]. Стимулятор роста Корневин, добавленный в питательную среду А, проявил более выраженную степень влияния на пролиферативную активности калусных клеток корнеплодов моркови *Daucus carota L.* по сравнению со стимулятором роста Green Belt, добавленным в питательную среду В.

В процессе культивирования тканей корнеплодов моркови в некоторых пробах наблюдались признаки микробной контаминации, преимущественно микроскопическими грибами рода *Aspergillus niger* или *Penicillium* (рис. 5).

Однако микробная контаминация отмечалась не на всех пробах. Вероятно, в пробах, на которых отсутствуют признаки контаминации, соблюдались условия стерильности при культивировании калусной ткани. В пробах с признаками контаминации, вероятно, не были соблюдены условия стерильности при обработке инструментов или при выдержке кусочков моркови в дезинфицирующем средстве.

Выводы.

1. Разработан состав питательных сред для биотехнологической оценки влияния коммерческих образцов стимуляторов роста растений на пролиферативную активность растительных клеток.

2. Стимулятор роста Корневин, добавленный в питательную среду А, проявил, по сравнению со стимулятором роста Green Belt, более выраженную степень влияния на пролиферативную активности каллусных клеток корнеплодов моркови *Daucus carota L.* Пролиферативная активность клеток отмечена при их культивировании как в условиях дневного комнатного освещения, так и в условиях темноты.

3. Культивирование каллусных тканей рекомендовано применять в качестве метода биотестирования коммерческих образцов стимуляторов роста растений на пролиферативную активность растительных клеток и тканей.

Список литературы

1. Петрова Л.Н. Влияние регуляторов роста на развитие и продуктивность растений. М. СНИИСХ, 1988, С.104-110.

2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М. ФБК-ПРЕСС, 1999 г., 160 с.

3. Куликова Е.И., Чухина О.В. Учебно — методическое пособие для выполнения лабораторно-практических занятий и самостоятельной работы. ФГБОУ ВПО «Вологодская государственная молочнохозяйственная академия им. Н.В.Верещагина. С.2

4. Nechayeva T., Voronkov A., Zagoskin N.atalia. Changes of morphometric parameters of callus culture cells in tea plant with short-term light exposure // Subtropical and ornamental horticulture. 2018. 106-110. 10.31360/2225-3068-2018-64-106-110.

УДК 547.857.4: 616.12-008.331.1: 616.316-008.8: 612.3: 612.4.05

Попов А.С., Иванова И.С., Крылова Л.С., Стручков Д.А.
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург
aleksei.popov@szgmu.ru

БИОХИМИЯ СЛЮНЫ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАК ПОКАЗАТЕЛИ СТРЕССА ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННОГО КОФЕИНОМ

Выявлена корреляция между приемом субмаксимальных одноразовых доз кофеина и биохимическими и физиологическими показателями (активность альфа-амилазы, содержание неорганического фосфора и кальция в слюне, артериальное давление, частота сердечных сокращений). Показано, что однократное получение 200 мг кофеина приводит к изменениям, характерных для выраженного психоэмоционального стресса.

Ключевые слова: кофеин, артериальное давление, частота сердечных сокращений, альфа-амилаза, неорганический фосфор, кальций, минерализующие свойства слюны.

Popov A.S., Ivanova I.S., Krylova L.S., Struchkov D.A.
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg

SALIVA BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AS INDICATORS OF HUMAN STRESS CAUSED BY CAFFEINE

A correlation was found between the intake of submaximal single doses of caffeine and biochemical and physiological parameters (alpha-amylase activity, the content of inorganic phosphorus and calcium in saliva, blood pressure, heart rate). It has been shown that a single intake of 200 mg of caffeine leads to changes characteristic of severe psychoemotional stress.

Keywords: caffeine, blood pressure, heart rate, alpha-amylase, inorganic phosphorus, calcium, saliva mineralizing properties.

Для оценки наличия и глубины стрессового состояния, как правило, используют различные психологические тесты (диагностика состояния стресса по А.О. Прохорову, шкала реактивной (ситуативной) и личностной тревожности Ч.Д. Спилбергера, Ю.Л. Ханина и др. [1]. В рамках доказательной медицины целесообразнее исследовать информативные биологические жидкости: плазму крови, мочу, а также слюну. Преимуществами при исследовании слюны можно назвать быстроту, гигиеничность и неинвазивность. Информативность биохимического анализа слюны объясняется наличием таких биомаркеров как количество отделяемой слюны, скорость слюноотделения, секреция альфа-амилазы, которая продуцируется околоушными и поднижнечелюстными слюнными железами, а также показатели минерализующих свойств слюны (содержание неорганического фосфора и кальция) [2]. Показано, что уровень адреналина в плазме крови коррелирует с количеством секрета слюнных желез и концентрацией в ней альфа-амилазы. Мурексидная проба является достоверным способом идентификации кофеина и других производных пурина, она используется как основа в ряде физико-химических инструментальных методов [3]. Смешанная слюна является жидкостью организма, которая отвечает не только за пищеварение, но и обеспечивает процессы минерализации и реминерализа-

ции зубной эмали. Зубная эмаль на 95% минерализована и содержит различные минеральные формы солей кальция и фосфорной кислоты (гидроксиапатит, фторапатит, карбонатапатит). Изменение состава смешанной слюны, ее концентрации, плотности и количества приводит к смещению химического равновесия в ротовой полости [4], изменению pH [5] и, как следствие, уменьшению минерализующей и реминерализующей функций. В нормальном состоянии смешанная слюна содержит практически 95% воды, биохимический компонент по массе — это в основном белки. Для неорганического компонента характерно содержание ионов кальция 3–8 мэкв/л, что равно содержанию кальция в плазме. Содержание неорганического фосфора в форме гидрофосфата, дигидрофосфата, фосфата и различных полифосфатов, согласно, выше, чем в плазме крови в 5–10 раз. Необходимо также указать на присутствие в слюне некоторых пищеварительных ферментов (амилазы), ферментов антиоксидантной функции (супероксиддисмутазы, каталазы) и продуктов перекисного окисления липидов (малонового альдегида и диеновых конъюгатов). Указанные факты позволяют утверждать, что определение содержания иона кальция и неорганического фосфора, а также активности амилазы, поскольку они являются ответственными за минерализующую функцию слюны, сохранение структуры зубной эмали и стоматологический статус пациента, могут служить объективными характеристиками оценки стрессового состояния параллельно с физиологическими показателями.

Цель исследования. Выявить корреляцию между однократным приемом субмаксимальной дозы кофеина студентами медицинского вуза и физиологическими и биохимическими показателями: артериальное давление (АД), частота сердечных сокращений (ЧСС), активность альфа-амилазы и содержание неорганического фосфора и кальция в слюне, а также показать, что однократное получение нематриксальных доз кофеина приводит к изменениям, характерных для выраженного психоэмоционального стресса.

В качестве рабочей модели был выбран нагрузочный тест с кофеином как фактор психоэмоционального стресса. Известно, что кофеин, который обладает аналептическим, кардиотоническим и психостимулирующим действием, в коре головного мозга усиливает процессы возбуждения, а также влияет на дыхательный и сосудодвигательный центры, усиливает положительные условные рефлексы и двигательную активность. Повышает основной обмен, в частности, влияет на процессы обмена кальция, участвует в формировании

потенциала мышечных мембран. Со стороны сердечно-сосудистой системы — увеличивает частоту сердечных сокращений (ЧСС), при гипотензии повышает артериальное давление (АД) и не изменяет показатель при его нормальном значении.

Материалы и методы исследования. В эксперименте участвовало 50 студентов 1 курса лечебного факультета медицинского университета примерно одного возраста (18–19 лет) — 25 юношей и 25 девушек. Эксперимент был проведен в трёх повторностях по следующему плану: 1. Сбор слюны, измерение АД, ЧСС; 2. Прием 200 мг кофеина подъязычно (кофеин-бензоат натрия в таблетках: Татхим-фармпрепараты АО, 100 мг); 3. Измерение АД, ЧСС на 15-й минуте после приёма препарата; 4. Измерение АД, ЧСС и повторный сбор слюны на 30-й минуте. В анамнезе студенты злоупотребление чаем и кофе отрицают.

Собранные образцы слюны центрифугировались в течение 3 минут при 1500 об/мин. Использовались методики для проведения анализов на активность альфа-амилазы по методу Каравея (мг/л·с), содержания неорганического фосфора (ммоль/л) и кальция (ммоль/л). Принцип метода определения активности альфа-амилазы состоит в гидролизе крахмала под действием альфа-амилазы до продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Интенсивность уменьшения окраски йод-крахмального комплекса в единицу времени пропорциональна активности фермента; определяется спектрофотометрически при длине волны 630 нм. Использованный набор реактивов обеспечивает: чувствительность — не более 1,5 мг/(с · л); линейность при определении активности α -амилазы в течение 10 мин. от 3 мг/(с · л) до 25 мг/(с · л) с отклонением не более 7%. Коэффициент вариации — не более 7%. Метод определения содержания неорганического фосфора основан на способности фосфат-ионов образовывать в кислой среде с молибдатом аммония фосфорно-молибденовый комплекс в присутствии детергента. Спектрофотометрически измерялась оптическая плотность раствора при длине волны 340 нм, которая пропорциональна концентрации неорганического фосфора в исследуемом образце. Определение содержания кальция основано на образовании ионами кальция с комплексоном (о-крезолфталеин) окрашенного комплекса. Интенсивность окраски спектрофотометрически измерялась на 570 нм, она пропорциональна концентрации иона кальция в пробе. Результаты спектрофотометрического измерения оптической плотности анализируемых образцов пересчитывались в соответствии со стандартными формулами [6].

Результаты исследования и их обсуждение. Проведенное исследование выявило, что содержание неорганического фосфора в смешанной слюне изменялось следующим образом: у 39 человек (85%) возросло значительно, более, чем на 10%; у 7 человек (5%) — незначительно, на 3%. Снизилось содержание в 4 случаях (10%) значительно, более, чем на 10%.

Концентрация кальция снизилась у 55% испытуемых (27 чел.) более чем на 10%, у 9 человек (10%) — на 4 и 9%. Возросла в 15% случаев (6 чел.) значительно, более, чем на 10%; в 20% случаев (26 чел.) — незначительно, менее 5%.

Активность альфа-амилазы повысилась у 28 испытуемых (45%) значительно, от 20 до 50; у 8 чел. (20%) — незначительно, в среднем на 6%. Снизилась значительно у 8 чел. (20%), в среднем, на 13%; незначительно — у 6 чел. (15%), менее чем на 5%.

Изменения физиологических показателей происходили сложным и разнонаправленным образом. Для выяснения закономерностей участники эксперимента были разделены на 4 группы согласно их исходному артериальному давлению в состоянии покоя. Первая группа 19 студентов — оптимальное АД: из них значительно повысилось у 15 человек, незначительно у 2, снизилось у 2. Вторая группа 15 человек — нормальное пониженное АД: из них повысилось значительно у 10 человек, повысилось незначительно у 4, снизилось у 1 студента. Третья группа 8 человек — нормальное повышенное: из них значительно повысилось у 6 человек, повысилось незначительно у 2. Четвертая группа 8 человек — гипертензия I степени: из них снизилось значительно у 4 человек, снизилось незначительно у 4. Из 50 испытуемых у 41 студента ЧСС снизилась, у 6 возросла, у 3 не изменилась.

Доза кофеина, которую получали испытуемые в настоящем исследовании, составила 200 мг. Согласно литературным данным максимальная и безвредная масса кофеина для взрослого человека составляет до 400 мг. Следовательно, доза кофеина, исследованная в работе, фактически в два раза меньше предельного количества, которое считается безвредным при ежедневном длительном потреблении. Вместе с тем, даже применение указанной дозы привело к статистически достоверным физиологическим и биохимическим эффектам.

1. После приема кофеина, в подавляющем большинстве случаев, активность альфа-амилазы возрастает, увеличивается содержание неорганического фосфора, уменьшается содержание кальция. Из 50

испытуемых 4 респондента женского пола (10%) показали обратную зависимость по активности альфа-амилазы и содержанию кальция. В связи с тем, что действие кофеина на АД, ЧСС складывается из сосудистого и кардиального компонентов, в результате может развиваться как эффект стимуляции сердца, так и угнетение его деятельности. Выявлено сложное и разнонаправленное влияние кофеина на различные физиологические показатели, поэтому систематическое получение кофеина с пищей или прием максимальной дозы однократно может привести к непредвиденным отрицательным результатам как в процессе учебы (с распределенной во времени стрессовой нагрузкой), так и во время экзамена (когда стресс становится максимальным).

2. Выбранная модель оценки стрессорного воздействия на основе биохимических показателей слюны дает статистически значимые результаты и может применяться для широкого круга исследований стресса.

Список литературы

1. Клименко Д. И. Особенности познавательных процессов при действии стимуляторов нервных процессов у девушек — студентов медицинского университета / Д. И. Клименко // *Форсире*. 2021. Т. 4, № S1. С. 411–412.

2. Адсорбция антибиотиков на гидроксипатите / В. В. Гришин, В. В. Гришин, И. С. Иванова [и др.] // . 2020. Т. 63, № 7. С. 92–98. DOI 10.37952/ROI-jbc-01/20-63-7-92. EDN VGQYRR.

3. Разработка окислителя и условий проведения реакции для устойчивого и воспроизводимого определения кофеина методом мурексидной пробы / В. В. Бидоленко, А. С. Попов, И. С. Иванова, А. С. Чухно // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2022. № 4-2(118). С. 167–171. DOI 10.23670/IRJ.2022.118.4.103.

4. Иванова И. С. Из опыта изучения темы «Химическое равновесие» / И. С. Иванова, А. С. Попов, А. С. Чухно // *Химия в школе*. 2020. № 5. С. 73–76. EDN ZGH0BE.

5. Иванова И. С. Использование цифровых технологий в обучении химии студентов стоматологического факультета / И. С. Иванова, А. С. Попов, Л. Б. Гайковая // *Биохимия XXI века: Материалы научно-практической конференции с международным участием, Краснодар, 26 ноября 2021 года*. Краснодар: ООО «Качество», 2021. С. 108–112.

6. Количественный анализ содержания нитритов в рыбопродуктах методом фотометрии / И. С. Иванова, А. С. Попов, А. В. Чистякова, А. С. Чухно // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. 2020. № 6(65). С. 74-78.

УДК 57.033

*Соболева Н.Г.¹, Ланда С.Б.¹, Шалгуев В.И.¹, Обухова И.А.²,
Юнг И.А.¹, Филатов М.В.¹*

¹НИЦ «Курчатовский Институт» — ПИЯФ, Гатчина, Россия

²Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова,

Санкт-Петербург

soboleva_ng@pnpi.nrcki.ru

БЕЛКИ ПО-РАЗНОМУ УСТОЙЧИВЫ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИМПУЛЬСА

В данной работе изучалась стабильность третичной структуры белков после воздействия электрического импульса. Оценена стабильность третичной структуры трех глобулярных белков: бычьего сывороточного альбумина, зеленого флуоресцентного белка и рибонуклеазы А в растворе методом динамического светорассеяния (ДСР). Использование нового подхода, основанного на применении электропоратора для воздействия электрическим полем на белки и анализе результатов этого воздействия с помощью ДСР, позволяет оценивать стабильность белка в электрическом поле.

Ключевые слова: динамическое светорассеяние, распределение частиц по размерам, агрегация белков.

*Soboleva N.G.¹, Landa S.B.¹, Shalguev V.I.¹, Obukhova I.A.²,
Yung I.A.¹, Filatov M.V.¹*

¹NRC «Kurchatov Institute» — PNPI, Gatchina

²St. Petersburg State Forestry University named after S.M. Kirov,
St. Petersburg

PROTEINS ARE DIFFERENTLY RESISTANT TO ELECTRICAL IMPULSES

In this work, the stability of the tertiary structure of proteins after exposure to an electrical pulse was studied. The stability of the tertiary structure of three globular proteins: bovine serum albumin, green fluorescent protein and ribonuclease A in solution was assessed by dynamic light scattering (DLS). The use of a new approach based on the use of an electroporator to expose proteins

to an electric field and the analysis of the results of this effect using DLS allows one to evaluate the stability of a protein in an electric field.

Keywords: *dynamic light scattering, particle size distribution, protein aggregation.*

Актуальность. Электропорация — это один из наиболее эффективных способов внедрить в клетки бактерий, дрожжей, млекопитающих, водорослей дополнительные элементы (белки, ДНК, РНК, экзосомы, рибонуклеопротеиновые комплексы и т.д.) в зависимости от целей исследования [1]. В процессе электропорации на клетку воздействует электрический импульс с определенными параметрами. Возникает вопрос, в какой мере электроимпульс влияет на привносимые элементы, в частности, на белки. Известно, что при различных внешних воздействиях белки способны к агрегации, существует несколько механизмов агрегации: агрегация, вызванная высокой концентрацией белка; агрегация, вызванная конформационными изменениями; агрегация, вызванная химическими реакциями; нуклеационно-зависимая агрегация и поверхностная агрегация [2]. В работе [3] было экспериментально показано, что воздействие микроволнового облучения на термостабильный фермент β -галактозидазу приводит к необратимой инактивации, и этот результат связан не с нагревом белка, а является следствием влияния высокочастотного электромагнитного поля. На модели полиаланина методами молекулярной динамики показано [4], что приложение сильного переменного электрического поля в микроволновом диапазоне, приводит к изменению конформационного состояния полипептида.

Цель. Исследование процесса агрегации белков *in vitro* под действием электрического поля. Для изучения были выбраны три белка различающейся молекулярной массы: бычьего сывороточного альбумина (БСА, 69 кДа), зеленого флуоресцентного белка (GFP, 26,9 кДа) и рибонуклеазы А (РНКаза А, 13,7 кДа). Для белка РНКаза А мы оценивали пороговые значения напряжения электроимпульса, при которых агрегация не наблюдается. Анализируя агрегацию белков, можно судить об их денатурации.

Материалы и методы. Для приготовления растворов белков использовалась таблетированная форма фосфатно-солевого буфера (PBS), pH 7.4 («Росмедбио», Россия): 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1.8 mM KH_2PO_4 ; 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5 mM MgCl_2 . Исследования проводились на коммерческих препаратах белков: бычий сывороточный альбумин (БСА) (чистота не менее 95%, «BioloT»,

Россия), рибонуклеаза А (РНКаза А) из поджелудочной железы быка (серия Р-13-01, «BioloT», Россия). Зеленый флуоресцентный белок GFP был получен экспрессией коммерческой плазмиды рEGFP в клетках BL21(DE3) с последующим выделением из бактериального лизата [5]. Эксперименты по изучению динамического светорассеяния белковых растворов проводились на лазерном корреляционном спектрометре «ЛКС-03» («Интокс», Россия). Воздействие электрического импульса на раствор соответствующего белка осуществлялось в аппарате для электропорации «Multiporator» («Eppendorf», США). Количественная оценка уменьшения числа мономеров белка проводилась методом динамического светорассеяния с анализом процентного содержания сохранившихся после воздействия мономеров. Метод ДСР основан на взаимодействии монохроматического когерентного излучения со светорассеивающими частицами исследуемой жидкости. Суть метода ДСР подробно описана ранее [6, 7]. В табличных данных в качестве результата приведено среднее значение гидродинамического радиуса \pm среднеквадратичное отклонение. Отсутствие изменения температуры раствора каждого белка после воздействия электроимпульса контролировали термпарой Mastech R MS8217. Препараты БСА, GFP и РНКазы А разводили в буфере PBS до конечной концентрации 0.5 мг/мл. Объем реакционной смеси составлял 200 мкл в стандартной пластиковой кювете с зазором 4 мм. Электропоратор программировали на подачу одиночного электрического импульса, соответствующего диапазону напряжений от 20 В до 400 В, воздействие длилось от 15 мкс до 200 мкс. Измерения ДСР проводились непосредственно после подачи электроимпульса.

Полученные результаты. Измерения ДСР были проведены для трёх глобулярных белков: БСА (гидродинамический радиус $R_h = 4 \pm 1$ нм [8]), GFP ($R_h = 2.30 \pm 0.05$ нм [9]), РНКазы А ($R_h = 1.90 \pm 0.04$ нм [10]). Приложение электрического импульса к раствору приводило при определенных условиях к агрегации белков с образованием комплексов из нескольких мономеров белка. На рисунке 1 в качестве примера приведены результирующие гистограммы зависимости вклада мономеров и агрегатов РНКазы А в светорассеяние (в процентах) при некоторых амплитудах напряжения при фиксированной длительности импульса, равной 100 мкс.

На гистограмме на рис. 1а приведены данные для РНКазы А, не подвергавшейся воздействию поля. Явно видны три пика: один соответствует вкладу мономеров в светорассеяние (56.1%), два других — вкладу в светорассеяние структур с различной степенью

агрегации (23,8 и 20,2%). На гистограмме на рис. 1б, соответствующей РНКазе А, подвергавшейся воздействию электроимпульса с амплитудой 50 В, длительностью 100 мкс также можно видеть три пика: один соответствует вкладу мономеров в светорассеяние (45,6%), два других — вкладу в светорассеяние тех же агрегатов (52,7 и 1,7%), то есть мы наблюдаем уменьшение вклада мономеров в светорассеяние, и, следовательно, увеличение вклада агрегатов большего гидродинамического радиуса. При дальнейшем увеличении напряжения (рис. 1в) вклад мономеров РНКазы А в светорассеяние продолжает уменьшаться, а для агрегатов растёт. На рис. 1г при напряжении импульса 400 В вклад мономеров белка РНКазы А в светорассеяние вообще отсутствует. Подобные серии измерений вклада в светорассеяние частиц при фиксированном времени и разном напряжении, либо при фиксированном напряжении и разном времени воздействия электроимпульса проведены также для растворов альбумина и GFP.

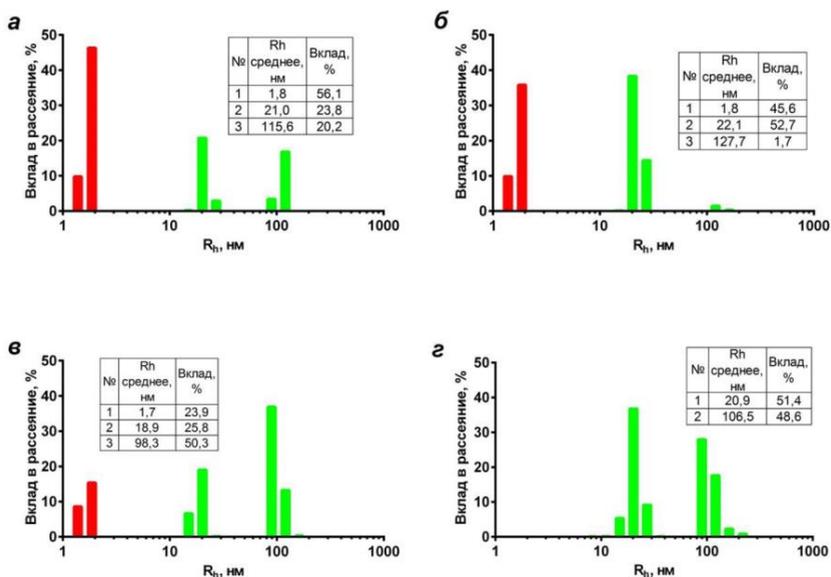


Рис. 1. Зависимость вклада в светорассеяние от величины гидродинамического радиуса (препарат РНКазы А) при времени воздействия электроимпульса 100 мкс для следующих значений напряжения:

а) 0 В (контроль); б) 50 В; в) 100 В; г) 400 В

Для проверки предположения, что агрегация белков связана с воздействием электроимпульса, а не следствие повышения температуры раствора под воздействием этого импульса при указанных условиях, были проведены контрольные эксперименты. Измеряли температуру раствора белка в кювете для электропорации непосредственно перед подачей электроимпульса и сразу же после. Никакого заметного изменения температуры не наблюдалось.

По совокупности полученных данных ДСР были определены зависимости вклада мономеров в светорассеяние для всех трёх белков от напряжения импульса при времени воздействия импульса 100 мкс (рис. 2а) и от времени воздействия импульса при напряжении импульса 200 В (рис. 2б).

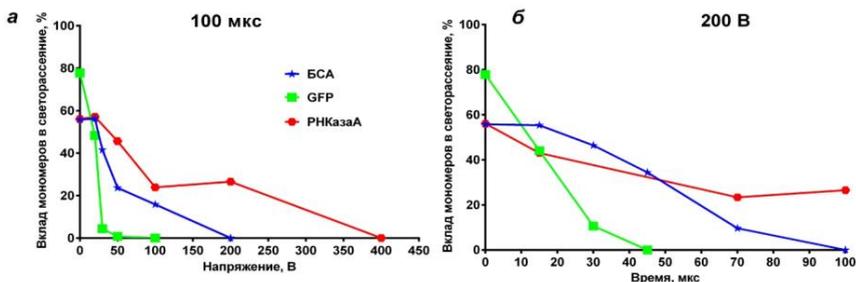


Рис. 2. Зависимость вклада мономеров в светорассеяние: а) от напряжения импульса при времени воздействия импульса 100 мкс; б) от времени воздействия импульса при напряжении импульса 200 В

Был также определен относительный вклад мономеров в светорассеяние как разность между абсолютным вкладом мономеров в светорассеяние для белкового раствора без воздействия импульса (контролем) и абсолютным вкладом мономеров в светорассеяние для белкового раствора после воздействия импульса, отнесённая к величине контроля для каждого белка (рис. 3, а, б).

Из этих графиков видно, что из трёх изученных белков GFP наименее устойчив к воздействию электроимпульса в плане своей третичной структуры: уже при малых напряжениях из выбранного диапазона происходит его агрегация. Несколько более устойчивым к воздействию электроимпульса оказался БСА, он переходит в агрегированное состояние при больших, чем для GFP, напряжениях. Самым стабильным белком оказалась РНКза А, этот белок агре-

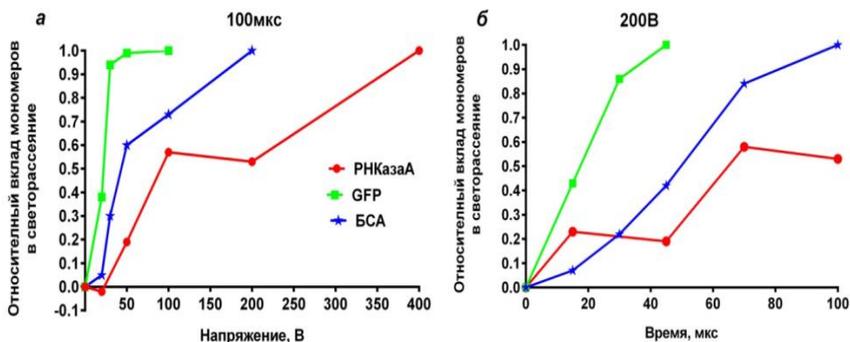


Рис. 3. Зависимость относительного вклада мономеров в светорассеяние: а) от напряжения импульса при времени воздействия импульса 100 мкс; б) от времени воздействия импульса при напряжении импульса 200 В. Относительный вклад мономеров — это разность между контролем и экспериментом, отнесенная к величине контроля для каждого белка

гировал при бoльших значениях напряжения по сравнению с БСА, а именно, при значении импульса 200 В, (длительность 100 мкс) мономеров БСА уже не наблюдалось, а в растворе РНКазы А их оставалось ещё около 26% (рис. 2, а). Кроме того, для РНКазы А установлен диапазон, в котором находится пороговое значение напряжения импульса 50–100 В, зависящее от времени экспозиции 15 мкс; а также диапазон, в котором находится пороговое значение напряжения импульса 20–50 В, зависящее от времени экспозиции 100 мкс, при котором РНКазы А начинает агрегировать (таблица).

При фиксированном напряжении импульса 200 В в изученном временном диапазоне (до 100 мкс) добиться полного перехода РНКазы А в агрегированное состояние так и не удалось, 26.6% белка по-прежнему оставалось в виде мономеров, в то время как при 200 В, как мы уже отмечали, мономеров БСА уже не наблюдалось. При 70 мкс процент мономеров РНКазы А в 2.4 раза превышал процент мономеров БСА. При этом же значении напряжения момеры GFP полностью исчезали уже при 45 мкс.

Выводы. Агрегация белков протекает *in vitro* в результате возмущающих воздействий, нарушающих нативную структуру белка. Степень агрегации белков зависит от напряжения импульса и его длительности. В заданном диапазоне при малых значениях напряжения

Таблица. Зависимость вклада мономеров в светорассеяние в зависимости от времени воздействия и от напряжения импульса для трех белков: БСА, GFP, РНКазы А

Белок	Время, мкс	Напряжение, В	Вклад в светорассеяние, %
БСА	0	0	59.2±2.6
	15	200	55.3±0.7
	30	200	46.4±1.3
	45	200	34.4±2.4
	70	200	9.7±1.1
	100	20	56.2±1.0
	100	30	41.5±3.3
	100	50	23.6±1.8
	100	100	15.9±2.3
	100	200	0
GFP	0	0	77.8±1.7
	15	200	44.1±2.1
	30	200	10.6±1.5
	45	200	0
	100	20	48.3±2.1
	100	30	4.4±0.4
	100	50	0.8±0.2
	100	100	0
РНКазы А	0	0	56.1±1.0
	15	50	63.1±2.7
	15	100	50.2±1.2
	15	200	43.0±0.7
	70	200	23.4±0.5
	100	20	57.1±1.9
	100	50	45.6±2.2
	100	100	23.9±1.6
	100	200	26.6±1.0
	100	400	0

либо времени воздействия электроимпульса белковые молекулы разных типов агрегируют по-разному, что, возможно, свидетельствует о разной стабильности их третичной структуры. Обнаруженные значения напряжения и импульса, при воздействии которого

в растворе присутствуют только агрегаты белковых молекул, позволяют оценить устойчивость упаковки белка. Предположение, что чем меньше молекулярная масса белка, тем устойчивее его третичная структура, и, следовательно, в нашем случае, больший электроимпульс (по напряжению либо времени) должен быть подан для агрегации этого белка, подтвердилось в отношении РНКазы А по сравнению с БСА и GFP. Это совпадает с общеизвестными данными, что белок РНКазы А очень термостабилен и не теряет своей активности после кипячения. Однако устойчивость белка GFP к воздействию электроимпульса оказалась меньшей, чем устойчивость БСА. Видимо, это связано с тем, что третичная структура GFP, хотя и упорядочена особым образом и имеет бочкообразный вид, но состоит из большого количества β -слоёв, тогда как БСА состоит в основном из α -спиралей, которые более устойчивы, чем β -слои [11]. Итак, стабильность укладки белков может быть оценена с помощью предложенного нами подхода.

Список литературы

1. Weaver J. C., Chizmadzhev Y. A. Theory of electroporation: a review // *Bioelectrochemistry and bioenergetics*. 1996. Т. 41. №. 2. С. 135-160.
2. Cromwell M. E. M., Hilario E., Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing // *The AAPS journal*. 2006. Т. 8. С. E572-E579.
3. La Cara F. et al. Different effects of microwave energy and conventional heat on the activity of a thermophilic β -galactosidase from *Bacillus acidocaldarius* // *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*. 1999. Т. 20. №. 3. С. 172-176.
4. Solomentsev G. Y., English N. J., Mooney D. A. Effects of external electromagnetic fields on the conformational sampling of a short alanine peptide // *Journal of computational chemistry*. 2012. Т. 33. №. 9. С. 917-923.
5. Samarkina O. N. et al. Universal and rapid method for purification of GFP-like proteins by the ethanol extraction // *Protein expression and purification*. 2009. Т. 65. №. 1. С. 108-113.
6. Лебедев А. Д., Левчук, Ю.Н., Ломакин А. В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Наукова думка, 1987.
7. Ланда С. Б., Кораблев П. В., Филатов М. В. Определение иммунных комплексов и их изотипического состава в биологических жидкостях в ответ на предъявление антигенов методом динамического светорассеяния // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2016. Т. 1. №. 2. С. 163-167.

8. Visser A. J., Westphal A. H., Skakun V. V., Borst J. W. GFP as potential cellular viscosimeter // Methods and applications in fluorescence. 2016. Т. 4. №. 3. С. 035002.

9. Nöppert A., Gast K., Müller-Frohne M., Zirwer D., Damaschun G. Reduced-denatured ribonuclease A is not in a compact state // FEBS letters. 1996. Т. 380. №. 1-2. С. 179-182.

10. Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка: курс лекций. М.: Книжный дом университет. 2002.

УДК 612.818+616.831-005.4

Теплых К.А., Вольхина И.В.

*Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург
kat090900@mail.ru*

BDNF И ИШЕМИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Острый ишемический инсульт является одной из наиболее частых причин смерти и инвалидности во всем мире. Использование в процессе лечения инсульта препаратов, реализующих своё действие через сигнальный путь АМПК/СРЕВ/BDNF, приводит к увеличению содержания BDNF, что способствует выживанию клеток и улучшению состояния больного после остроого ишемического инсульта.

Ключевые слова: BDNF; ишемия головного мозга; лечение.

Теплых К.А., Volkhina I.V

*St. Petersburg State Pediatric Medical University,
St. Petersburg
kat090900@mail.ru*

BDNF AND CEREBRAL ISCHEMIA

Acute ischemic stroke is one of the most frequent causes of death and disability worldwide. The use of drugs realizing their action through AMPK/CREB/BDNF signaling pathway in the process of stroke treatment leads to the increase of BDNF content, which promotes cell survival and improves the patient's condition after acute ischemic stroke.

Keywords: BDNF; brain ischemia; treatment.

К одной из серьезных проблем современного здравоохранения относится цереброваскулярная патология. Острый ишемический инсульт является одной из наиболее частых причин смерти и инва-

лидности во всем мире. Среди многообразия патофизиологических механизмов развития острой ишемии ключевым фактором является резко возникающий дефицит поступления к мозгу кислорода и глюкозы. В дальнейшем ишемическое повреждение мозга приводит к развитию окислительного стресса и эксайтотоксичности глутамата. Запускаются сложные процессы нейровоспаления, некроза и апоптоза как нейронов, так и глиальных клеток [1]. Однако быстрое восстановление кровотока (реперфузия) после ишемии может вызвать вторичное повреждение, называемое ишемически — реперфузионным повреждением, которое является даже более серьезным, чем простое ишемическое повреждение головного мозга. Гибнет большое количество нейронов, что приводит к распространенному инфаркту и тяжелой когнитивной дисфункции [2].

Реперфузия с последующей нейропротекцией и нейрорегенерацией является основной целью современных стратегий лечения инсульта, в связи с чем вызывают интерес исследования *in vitro* и *in vivo* о роли различных веществ в приобретении клетками головного мозга толерантности к недостатку кислорода, а также в восстановлении нейронов после перенесенной ишемии.

Нейротрофины являются белками, регулирующими выживание и функционирование центральных и периферических нейронов. К наиболее хорошо изученным представителям этого семейства относится фактор роста нервов (Nerve Growth Factor, NGF) [3] и нейротрофический фактор мозга (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF). В научной литературе активно обсуждается важное значение нейротрофинов в процессе выживания нейронов и их восстановления.

BDNF синтезируется нейронами и клетками глии. Также этот нейротрофин обнаружен на периферии в клетках эндотелия, тромбоцитах, печени и мышечной ткани [4]. Зрелая форма BDNF, связываясь с В-рецептором внутриклеточной тирозин-киназы (TrkB), активирует сигнальные пути фосфолипазы C (PLC), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) [5], запуская каскады фосфорилирования, что, в свою очередь, приводит к индукции экспрессии генов, синтезу белка, росту аксонов и дендритов, повышению выживаемости нейронов, усилению нейрогенеза.

Целями данного исследования стали систематизация, анализ и обобщение научных данных о роли BDNF при ишемии головного мозга.

Ткань мозга по периферии инфаркта названа пнеумброй — зоной ишемизированой, но живой ткани, где присутствуют функциональные, но не структурные изменения клеток. За счет данной зоны происходит постепенное увеличение размеров инфаркта в первые часы и дни после развития инсульта, и именно она является главной мишенью применения нейропротективных средств с целью восстановления жизнедеятельности клеток [6].

Результаты экспериментальных исследований на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах показали, что устойчивость нейронов к ишемии-реперфузии связана с содержанием в них BDNF и TrkB. В постреанимационном периоде наблюдалось снижение общей плотности нейронов в мозжечке и гиппокампе крыс через несколько дней после ишемии-реперфузии за счет клеток с минимальным и средним содержанием нейротрофина. Клетки, содержащие наибольшее количество BDNF, выживали [7]. В связи с полученными данными актуален вопрос о использовании BDNF как части постшемической терапии.

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) предположительно играет центральную роль в восстановлении мозга после церебральной ишемии, однако нейроны являются не единственными источниками BDNF после инсульта, существенный вклад также вносят эндотелиальные, эндотелиальные клетки, микроглия и астроциты [8]. Следовательно, не нейрональные клетки тоже относятся к перспективным мишеням для разработки стратегий, направленных на улучшение восстановления после инсульта с помощью механизмов, связанных с BDNF.

Лечение низкими дозами метформина *in vitro* после быстрой реперфузии, вызывающей вторичное повреждение ткани, повышает экспрессию BDNF в эндотелиальных клетках в области ишемической полутени АМПК-зависимым образом, тем самым уменьшая отек головного мозга, количество апоптотических нейронов, объем инфаркта и показатель неврологического дефицита [9].

На культуре клеток было показано, что лечение апремиластом может значительно снизить апоптоз астроцитов и гибель клеток, вызванную кислородно-глюкозной депривацией и реоксигенацией. Апремиласт является ингибитором разрушающей цАМФ фосфодиэстеразы 4. цАМФ служит нейропротекторным средством, способствуя восстановлению нейронов посредством опосредованного протеинкиназой (АМПК) фосфорилирования белка, вызывающего активацию транскрипционного фактора (CREB) и последующую

экспрессию BDNF и антиапоптотического Vcl-2. Увеличение количества BDNF и Vcl-2, индуцированное апремиластом, приводило к снижению апоптоза астроцитов. Эти предварительные результаты указывают на то, что апремиласт может обладать потенциалом предотвращения гибели астроцитов и способствовать восстановлению нейронов при ишемическом повреждении головного мозга [10].

Таким образом, использование в процессе лечения инсульта препаратов, реализующих своё действие через сигнальный путь AMPK/CREB/BDNF, приводит к увеличению содержания BDNF, что способствует выживанию клеток и улучшению состояния больного после острого ишемического инсульта.

Список литературы

1. Kalinichenko S.G., Pushchin I.I., Matveeva N.Yu. Neurotoxic and cytoprotective mechanisms in the ischemic neocortex // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2023. № 128. P. 102230. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2022.102230.

2. Lin L., Wang X., Yu Z. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies // *Biochem. Pharmacol. (Los Angel)*. 2016. № 5(4). P. 213. DOI: 10.4172/2167-0501.1000213.

3. Вольхина И.В., Винников И.С. Клиническое значение фактора роста нервов (обзор литературы) // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023. №6. С. 333-340. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-6-333-340.

4. Острова И.В., Голубева Н.В., Кузовлев А.Н., Голубев А.М. Прогностическая чувствительность и терапевтический потенциал мозгового нейротрофического заболевания BDNF при поражении головного мозга (обзор) // *Общая реаниматология*. 2019. № 1. С. 70-86. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-1-70-86.

5. Стамбольский Д.В., Плеханова О.С., Юдина И.Ю., Калинина Н.И., Карагяур М.Н., Дубров В.Э., Кочиш А.Ю., Семина Е.В., Акопян Ж.А., Голубев И.О., Антонов А.В., Сафин Ш.М., Ткачук В.А. Система мозгового нейротрофического фактора (BDNF) как мишень для создания лекарственных средств, восстанавливающих иннервацию // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017. № 61(4). С. 142–152. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8534.

6. Yang S.-H., Liu R. Four Decades of Ischemic Penumbra and Its Implication for Ischemic Stroke // *Translational stroke research*. 2021. № 12(6). P. 937-945. DOI: 10.1007/s12975-021-00916-2.

7. Острова И.В., Аврущенко М.Ш., Голубев А.М., Голубева Н.В. Роль мозгового нейротрофического фактора BDNF и его рецептора TrkB в устойчивости нейронов гиппокампа к ишемии-реперфузии (экспериментальное исследование) // *Общая реаниматология*. 2018. № 14(6). P. 41-50. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-6-41-50.

8. Béjot Y., Prigent-Tessier A., Cachia C., Giroud M., Mossiat C., Bertrand N., Garnier P., Marie C. Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats // *Neurochemistry International*. 2010. № 58(1). P. 102-111. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.10.019.

9. Liu K., Li L., Liu Z., Li G., Wu Y., Jiang X., Wang M., Chang Y., Jiang T., Luo J., Zhu J., Li H., Wang, Y. Acute Administration of Metformin Protects Against Neuronal Apoptosis Induced by Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Regulation of the AMPK/CREB/BDNF Pathway // *Frontiers in pharmacology*. 2022. № 13. P. 832611. DOI: 10.3389/fphar.2022.832611.

10. Yin H., Qin H., Wang T., Zhang Q., Yang Q. The Protective Effects of Apremilast Against Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion (OGD/R)-Induced Inflammation and Apoptosis in Astroglia Mediated by CREB/BDNF // *Neurotoxicity Research*. 2021. № 39(3). P. 754-763. DOI: 10.1007/s12640-021-00340-2.

УДК 616-01/-099

Тимохина Д.Д.¹, Жерегеля С.Н.¹, Глушков С.И.²

*¹Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет,*

*²Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова,*

Санкт-Петербург

ostemporalelele@gmail.com

РОЛЬ РААС В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК, ВЫЗВАННОГО СЕПСИСОМ

Сепсис — одна из ключевых проблем современной интенсивной терапии и основная причина летальных исходов в ОРИТ. Более того, сепсис в сочетании с гиповолемией — одна из ведущих причин развития ОПП. При этом наиболее частым осложнением сепсиса является С-ОПП, при котором возникает внезапная дисфункция почек, сопровождаемая повреждением эндотелиоцитов, воспалением, оксидативным стрессом и нарушением коагуляции. Ввиду того, что РААС является мощным

механизмом модуляции ответов в ситуациях стресса, в т.ч сепсиса, ее гиперактивация играет важную роль в модуляции воспалительных реакций, создании провоспалительной и протромботической среды, что усугубляет повреждение почечной ткани, канальцев и сосудистой сети и еще больше способствует развитию С-ОПП.

Ключевые слова: сепсис, С-ОПП, РААС, оксидативный стресс, ACEi, ARB.

Timokhina D.D.¹, Zheregelya S.N.¹, Glushkov S.I.²

¹*St. Petersburg State Pediatric Medical University,*

²*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg*

ROLE OF THE RAAS IN THE PATHOGENESIS OF SEPSIS-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY

Sepsis is one of the key problems of modern intensive care and the main cause of deaths in the ICU. Moreover, sepsis in combination with hypovolemia is one of the leading causes of AKI. At the same time, the most common complication of sepsis is S-AKI, in which sudden kidney dysfunction occurs, accompanied by endotheliocyte damage, inflammation, oxidative stress and coagulation disorders. Due to the fact that RAAS is a powerful mechanism for modulating responses in stress situations, including sepsis, its hyperactivation plays an important role in modulating inflammatory reactions, creating a proinflammatory and prothrombotic environment, which exacerbates damage to renal tissue, tubules and vascular network and further contributes to the development of S-AKI.

Keywords: sepsis, S-AKI, RAAS, oxidative stress, ACEi, ARB.

Сепсис — это жизнеугрожающая полиорганная дисфункция, вызванная нарушением регуляции ответа организма на инфекционный процесс, при котором наблюдается системное поражение органов и тканей, а также возможен вариант развития септического шока — глубокой недостаточности кровообращения и обменных процессов. Причиной возникновения сепсиса может стать чрезмерный ответ иммунной системы на патогены: бактерии, вирусы или грибки. При этом рецепторы распознавания патогенов (PRR) распознают патоген-ассоциированные молекулярные структуры (РАМР), продукты метаболизма микроорганизмов (бактериальные липополисахариды, липопротеины, флагеллины, вирусный генетический материал). PRR активируются РАМР и запускают каскад иммунных реакций, при котором высвобождаются провоспалительные

тельные цитокины, такие как интерлейкин IL-1, IL-6 и фактор некроза опухоли (TNF)- α . Эти медиаторы воспаления воздействуют на эндотелиальные клетки, вызывая выход в экстравазат нейтрофилов и других воспалительных факторов. Эндотелиальная дисфункция, нерегулируемая естественными противовоспалительными и антикоагулянтными факторами, приводят к гипотонии и гиперкоагуляции. Сепсис диагностируется по неспецифическим критериям SIRS: температура свыше 38^oC или менее 36 ^oC, ЧСС выше 90 в мин, ЧДД более 20 в мин, PaCO₂ менее 32 мм рт.ст, повышенное или резко сниженное содержание лейкоцитов или более 10% незрелых лейкоцитов. Ввиду того, что некоторые из перечисленных признаков могут отсутствовать, в настоящее время широко применяется быстрая диагностика qSOFA: нарушение мышления, систолическое артериальное давление 100 мм рт.ст. или менее и/или ЧДД выше 22 в мин. Яркий признак сепсиса — глубокая гипотензия, которая влечет за собой гипоперфузию и повреждение органов. Наиболее часто сепсис развивается на фоне сопутствующей патологии. В последние годы наиболее часто преобладает легочный сепсис на фоне тяжелых пневмоний, инфекций брюшной полости, тяжелых перитонитов и панкреонекрозов, инфекций кровотока, катетероассоциированный сепсис. Проведение неадекватной инфузионной терапии, недооценка тяжести состояния неизбежно приводит к развитию и прогрессированию критических состояний, в том числе и ОПП как наиболее частого осложнения в отделениях реанимации и интенсивной терапии.

Говоря об этиологии развития ОПП, как критического состояния, это полиморбидная патология, которая развивается на фоне сепсиса, септического шока различной этиологии (абдоминальной, посттравматической, ожоговой, ангиогенной) либо их комбинации. В отдельную группу можно выделить пациентов кардиохирургического профиля с тяжелыми реконструктивными операциями на сердце и крупных магистральных сосудах, с развитием острой сердечно-сосудистой недостаточности на фоне декомпенсации хронической сердечной недостаточности, с синдромом малого сердечного выброса. У пациентов кардиохирургического профиля часто отмечается такое состояние, как развитие цитокинового шторма после использования аппаратов искусственного кровообращения, что приводит к развитию полиорганной недостаточности в раннем послеоперационном периоде. Дополнительные проблемы создают острые экзогенные отравления, приводящие к развитию критиче-

ских состояний и требующие проведения интенсивной терапии с применением методов экстракорпоральной гемокоррекции.

Итак, сепсис является наиболее распространенной причиной ОПП. Очень часто исходом купирования ОПП является развитие ХБП.

Патогенез развитие С-ОПП в первую очередь связывают с нарушениями внутрпочечной гемодинамики. На фоне течения основного септического процесса происходит его генерализация, как следствие прямого воздействия токсинов на клубочки и клубочково-канальцевый аппарат почек, так и за счет различных повреждающих факторов, связанных с активацией системы комплемента, цитокинов и т.д. Нарушение внутрпочечной гемодинамики связано с эффектом вазоконстрикции приносящих и выносящих артериол либо вазодилатации выносящей артериолы, при этом наблюдается снижение перфузионного давления в почках, что приводит к нарушениям кровоснабжения канальцевого аппарата, гибели подоцитов, мезангиальных клеток, развитию олиго-анурической стадии ОПП в целом. Дальнейшую роль в патогенезе С-ОПП играет развитие системной воспалительной реакции, которая включает в себя: увеличение синтеза NO, повышение проницаемости эндотелиального слоя сосудов микроциркуляторного русла, угнетение процессов фибринолиза и повышение коагуляционного потенциала не только с повреждением сосудов микроциркуляторного русла не только почек, но и в целом. Нарушение микроциркуляции приводит к снижению внутрпочечного интрагломерулярного давления и перитубулярного кровотока. На следующем этапе за счет метаболических изменений (снижения доставки и потребления кислорода, воздействия РАМР и DAMP с активацией свободнорадикального окисления, развития оксидативного стресса, митохондриальной дисфункции) формируется стойкое ОПП, требующее достаточно серьезной ЗПТ. Если ориентироваться на концентрацию уровня креатинина в сыворотке крови и объем выделяемой мочи (по часовому темпу диуреза), в ОПП выделяют три стадии, причем 2 и 3 стадии относятся к С-ОПП, при которых необходимо применение методов экстракорпоральной поддержки функции почек, в т.ч. методов, направленных на купирование септического шока с целью восстановления адекватной перфузии почек. Критерии терапии септического шока подразумевают потребность в вазопрессорах для поддержки среднего артериального давления 65 мм рт.ст. или выше и снижения уровня сывороточного лактата, как фактора, отражающего гипоперфузию.

Соответственно, наличие гипотензии, рефрактерной к коррекции волевических нарушений и лактат более 2 ммоль/л являются яркими предикторами летальных исходов, чем любой из этих маркеров, взятый по отдельности. Стоит отметить, что сопутствующие заболевания такие как сахарный диабет, болезни сердца, а также хроническая болезнь почек, также способствуют развитию септического шока.

Таблица 1. Концентрация креатинина в сыворотке крови и объем выделяемой мочи в зависимости от стадии ОПП

Стадия	Концентрация креатинина в сыворотке крови	Объем выделяемой мочи
1	В 1,5-1,9 раза выше исходного Или повышение на $\geq 0,3$ мг/дл ($\geq 26,5$ мкмоль/л)	$< 0,5$ мл/кг/ч за 6-12 ч
2	В 2,0-2,9 раза выше исходного	$< 0,5$ мл/кг/ч за ≥ 12 -24 ч
3	В 3,0 раза выше исходного Или повышение до $\geq 4,0$ мг/дл ($\geq 353,6$ мкмоль/л) или начало ЗПТ Или у пациентов младше 18 лет, Снижение рСКФ до < 35 мл/мин на 1,73 м ²	$< 0,3$ мл/кг/ч за ≥ 24 ч или анурия в течение ≥ 12 ч

Немаловажную роль в патогенезе С-ОПП играет следующий ряд проблем: повреждение эндотелиоцитов, окислительный стресс, коагуляционная дисфункция. В почках эндотелиоциты артериол, посткапиллярных венул, клубочков, претубулярных капилляров, вместе с подоцитами и мезангиальными клетками поддерживают фильтрацию, регулируют кровяное давление в микроциркуляторном русле почек. В эндотелиоцитах содержатся тельца Вейбеля-Палада, а также гранулы для хранения фактора фон Виллебранда (vWF) и ангиопоэтина-2 (Angpt2). Взаимодействие тромбоцитов с фактором Виллебранда активирует рецептор тирозинкиназы Tie2 с последующей секрецией Angpt2. Эта противовоспалительная функция необходима для восстановления тканей. Эндотелиоциты экспрессируют молекулы воспалительной адгезии, включая E-селектин, белок адгезии сосудистых клеток (VCAM1) и молекулу межклеточной адгезии 1 (ICAM1), в ответ на повышение уровня воспалительных цитокинов IL-6 и IL-8. При сепсисе противовоспалительные системы Tie2-Angpt2 подавляются воспалительными цитокинами. Конечным итогом является лейкоцитарная инфильтрация и отек тканей.

Обильное присутствие в кровотоке PRR активирует PAMP, которые приводят к высвобождению противовоспалительных медиаторов, включая IL-1, IL-6, TNF- α . Рецепторы TLR подтипа PAMP присутствуют в эпителиоцитах почечных канальцев, которые при сепсис-индуцированной активации вырабатывают провоспалительные цитокины и АФК. Избыток цитокинов в циркулирующей крови приводит к повреждению канальцевого аппарата почек, нарушению функционирования структурных белков и приводит к паракринному высвобождению неадаптивных факторов репарации. В свою очередь, накопление АФК приводит к оксидативному повреждению ДНК, белков и липидов. Последующее истощение системы антиоксидантной защиты и снижение способности клеток использовать кислород, приводит к повреждению и дисфункции на клеточном и органном уровнях. В ситуациях стресса эндотелий сосудов резко вырабатывает iNO для поддержания кровотока и противодействия вазоконстрикции эндотелином, норадреналином и ангиотензином II. При этом действие iNO распределено ненормально: наблюдается сильный сосудорасширяющий эффект в коре почек, отведение крови от медуллярной и перитубулярной областей нефрона. Дисбаланс почечной микроциркуляции приводит к тому, что данные области подвергаются ишемии. Более того, оксид азота является свободным радикалом, а побочные продукты — пероксинитрит и другие АФК, истощая антиоксиданты, способствуют окислительному стрессу в митохондриях. Воспаление и окислительный стресс вызывают разрушение слоя гликокаликса, нарушают функции антикоагулянтных и прокоагулянтных факторов и вызывают микротромбы, разрушая циркуляторный гомеостаз и в результате приводит к основному явлению, наблюдаемому при сепсисе — ДВС-синдрому. При ДВС-синдроме наблюдается образование микротромбов, приводящих к закупорке сосудов, ишемии органов, истощению прокоагулянтных факторов, что вызывает внутреннее кровотечение.

Сепсис вызывает вазодилатацию, приводит к системной гипотензии, и как следствие снижению перфузии почек, в результате активируется RAAS-мощный механизм регуляции АД и реагирования на стрессовые ситуации, включая сепсис. При гиперактивации в случае С-ОПП ангиотензин II усиливает экспрессию провоспалительных медиаторов, таких как TNF- α и IL-6; через AT1-R ангиотензин II активирует секрецию ICAM, что увеличивает миграцию иммунных клеток; ангиотензин II через рецептор ангиотензина II типа 2 (AT2-R) активирует фактор транскрипции ядерного фактора каппа β (NK-

кβ). В результате этого происходит повреждение тканей и еще большее воспалительное повреждение почек. Также ангиотензин II играет важную роль в окислительном повреждении компонентов почечных клеток посредством внутриклеточного образования АФК, таких как перекись водорода и супероксид-анион. Кроме того, ангиотензин II и активация им альдостеронсинтазы, стимулирующей высвобождение альдостерона из клубочковой зоны коры надпочечников, оказывают протромботическое действие, что может способствовать образованию микротромбов и гиперактивации свертывающего каскада. Протромботическая среда, индуцированная ангиотензином II, также влияет на микроциркуляцию артериол путем активации AT2-R, участвующего в иницировании тромба, и рецептора ангиотензина II типа 4 (AT4-R), участвующего в стабилизации тромба. AT2-R и AT4-R взаимодействуют с рецепторами брадикинина-1 и эндотелина-1A, опосредуя образование микрососудистых тромбов. Важен и АПФ, катализирующий преобразование ангиотензина I в ангиотензин II, так как он расщепляет брадикинин, сильный вазодилатор и стимулятор тканевого активатора плазминогена. Индуцированное ангиотензином II протромботическое состояние способствует повреждению почек вследствие окклюзии сосудов и ишемического повреждения микроциркуляторного русла почек. Протромботическое состояние является ключевым признаком С-ОПП.

В связи с этим можно сделать вывод, что антагонисты РААС, а именно ингибиторы АПФ, блокаторы рецепторов ангиотензина, благодаря своей способности уменьшать воспалительный и окислительный стресс, повреждение эндотелия, образование микротромбов, чрезвычайно полезны в борьбе с С-ОПП. Ингибиторы РААС замедляют прогрессирование фиброза почек, снижают клубочковое давление, предотвращают вазоконстрикцию эфферентных артериол, снижают продукцию цитокинов, особенно TGF-β, способствующего фиброзу клубочков. С другой стороны, антагонисты РААС снижают системное АД, что может усугубить гипотонию, и как следствие С-ОПП.

Список литературы

1. Смирнов А.В., Румянцев А.Ш. Острое повреждение почек. // Часть I. Нефрология. 2020. Т. 24, № 1. С. 67–95.
2. Sedra Tibi, Garbel Zeinalvand, Hina Mohsin Role of the Renin Angiotensin Aldosterone System in the Pathogenesis of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury: A Systematic Review. Published online in Pubmed 2023 Jul 8.

3. De Roquetaillade C, Jamme M, Charpentier J, Chiche JD, Cariou A, Mira JP, Pène F, Llitjos JF. Hemodynamic Impact of Cardiovascular Antihypertensive Medications in Patients With Sepsis-Related Acute Circulatory Failure. // Shock. 2020. № 54. P. 315–320. Pubmed.

4. Junichiro Shibata, Itsuki Osawa, Honoka Ito. et al. Risk factors of sepsis among patients with qSOFA<2 in the emergency department. // The American Journal of Emergency Medicine. 2021. Volume 50. P. 699–706.

5. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). // JAMA. 2016. Volume 315. P. 315–320.

УДК 615.011

*Торопцева А.В.¹, Горобец М.Г.¹, Бычкова А.В.¹,
Градова М.А.², Колотаев А.В.³, Хачатрян Д.С.^{1,3}*

*¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук,*

*²Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семенова Российской академии наук,*

*³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт»,
Москва
stropdiva@yandex.ru*

ПОЛУЧЕНИЕ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ПОКРЫТИЕМ ИЗ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТОЙ

Нами было протестированы различные стратегии получения наносистем на основе магнитных наночастиц (МНЧ), сывороточного альбумина (ЧСА) и N-гидроксисуццинимидного эфира фолиевой кислоты (мФК). Системы, в которых к ЧСА, закрепленному на поверхности МНЧ, добавляли мФК показали стабильность и агрегативную устойчивость, достаточную для длительного хранения и тестирования in vivo.

Ключевые слова: *N-гидроксисуццинимидный эфир фолиевой кислоты (мФК), сывороточный альбумин, наночастицы оксида железа, магнитные наночастицы*

*Toroptseva A.V.¹, Gorobets M.G.¹, Bychkova A.V.¹,
Gradova M.A.², Kolotaev A.V.³, Khachatryan D.S.^{1,3}*

*¹Emanuel Institute of Biochemical Physics
of Russian Academy of Sciences,*

*²N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics,
Russian Academy of Sciences,*

*³National Research Centre «Kurchatov Institute»,
Moscow*

OBTAINING SYSTEMS ON THE BASE OF MAGNETIC NANOPARTICLES (MNPs) WITH COVERAGE OF SERUM ALBUMIN MODIFIED WITH FOLIC ACID

Different strategies to form nanosystems on the base of MNPs, serum albumin (HSA) and folic acid residue has been tested. Systems formed through sequential adding of HSA to MNPs and following addition of N-hydroxy succinimide (NHS) ester of folic acid (mFA) showed stability and aggregative resistance which is enough for long-term storage of the systems and testing them under in vivo conditions.

Keywords: *N-hydroxy succinimide ester of folic acid, serum albumin, iron oxide nanoparticles, magnetic nanoparticles.*

Онкологические заболевания — одна из актуальнейших проблем в медицине XXI в. Несмотря на разработку и улучшение инновационных препаратов, одной из сложностей лечения этих заболеваний является токсичность лекарственных веществ из-за введения большого количества лекарства в организм человека, что порой наносит непоправимый ущерб.

В настоящее время высокий потенциал для лечения и диагностики рака имеют системы на основе магнитных частиц (МНЧ), часто используемые для адресной доставки лекарственных веществ. Активный транспорт лекарств этим способом позволяет снизить их токсическое воздействие на организм в целом, обеспечивая при этом целевое пролонгированное действие лекарства на пораженную область [1]. В качестве нацеливающих молекул часто используются антитела, аптамеры, пептиды и вещества с низким молекулярным весом, позволяющие наносистемам взаимодействовать со своими мишенями на поверхности раковых клеток или стенок кровеносных сосудов [2]. Механизмы нацеливания данных систем могут отличаться. Рецепторы к фолиевой кислоте экспрессируются некоторыми видами раковых клеток (в частности, раковыми клетками яичек

и яичников [3], носоглотки [4] и молочной железы [5]). Фолиевая кислота необходима для пролиферации, при этом количество ФК-связывающих рецепторов на поверхности раковых клеток существенно превышает таковое для нормальных клеток. Эти особенности взаимодействия ФК и раковых клеток стали причиной активного использования ФК в составе лекарственных систем, в частности систем для тераностики опухолей, содержащих МНЧ и сывороточный альбумин. Эффективность ФК в роли био вектора была показана на многих клеточных линиях [3, 6].

Однако магнитные частицы на основе неорганических соединений могут проявлять токсичность по отношению к живым организмам. Для повышения биосовместимости МНЧ могут покрывать белковыми покрытиями, одним из часто используемых белков в составе покрытий является человеческий сывороточный альбумин (ЧСА). Покрытия из ЧСА характеризуются высокой стабильностью и биосовместимостью, слабой токсичностью, а также способны снижать токсическое действие лекарственных средств на организм, повышать их растворимость и длительность циркуляции в крови [7, 8].

Данная работа нацелена на разработку методик модификации альбумина N-гидроксисукцинимидным эфиром фолиевой кислоты (мФК) на поверхности магнитных наночастиц. Для подтверждения связывания мФК с поверхностью МНЧ были использованы спектрофлуориметрия и спектроскопия в видимой и УФ областях.

Создание системы на основе МНЧ, на поверхности которых иммобилизован ЧСА, связанный с мФК, возможно различными способами:

- получение конъюгата мФК и ЧСА и последующая его адсорбция на поверхности наночастиц (способ 1);
- одновременное связывания мФК и ЧСА с поверхностью МНЧ (способ 2);
- последовательное связывание — сначала ЧСА с поверхностью МНЧ, далее связывание адсорбированного белка с мФК (способ 3).

Нами были реализованы все вышеперечисленные способы, полученные растворы оценивались на устойчивость при добавлении иммуноглобулина G, обладающего высоким сродством к поверхности МНЧ и приводящего к формированию агрегатов в случае неустойчивых и нецелостных покрытий из ЧСА [9, 10].

При способе 1 показано связывание мФК и ЧСА, проявляющееся в изменение спектров поглощения в области от 300 до 325 нм

смеси по сравнению со спектрами оригинальных веществ (рис. 1). Было отмечено, что изменения в спектрах происходят при инкубации более 2 часов, при увеличении длительности инкубации до 24 часов эффект становится более выраженным.

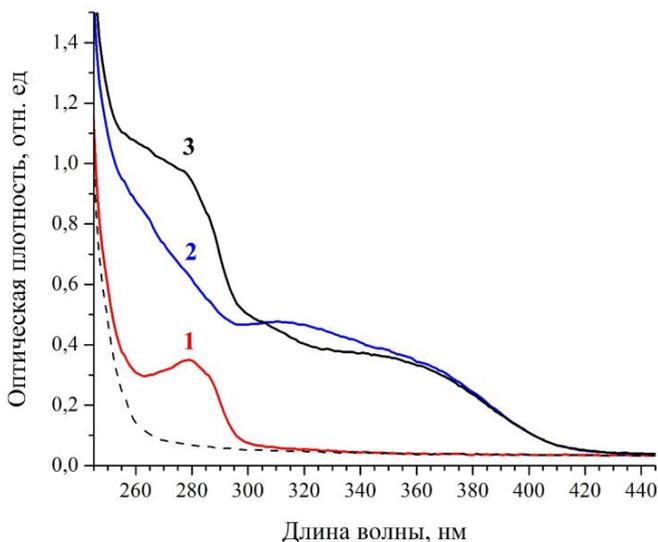


Рис. 1. Спектры поглощения образцов: ЧСА (1), мФК (2), ЧСА+мФК (3). $c(\text{ЧСА})=13,2$ мг/мл; $c(\text{мФК})=0,75$ мг/мл, разведение в 25 раз, инкубация в течение 4 часов; молярное соотношение мФК/ЧСА=7/1; пунктирная линия отображает среду

Эффект взаимодействия мФК и ЧСА также проявляется в тушении флуоресценции триптофана ЧСА (рис. 2), зависящем от концентрации добавленной мФК.

В дальнейшем производилось удаление несвязанной мФК путем центрифугирования, полученный конъюгированный с мФК ЧСА связывали с поверхностью МНЧ. Однако полученное покрытие показало слабую устойчивость и целостность. Таким образом, данная стратегия не показала себя перспективной для дальнейшей работы.

Эксперименты, проведенные по одновременному связыванию мФК и ЧСА с поверхностью МНЧ (способ 2) показали, что связывание мФК проходит успешно. В то же время системы обладали не-

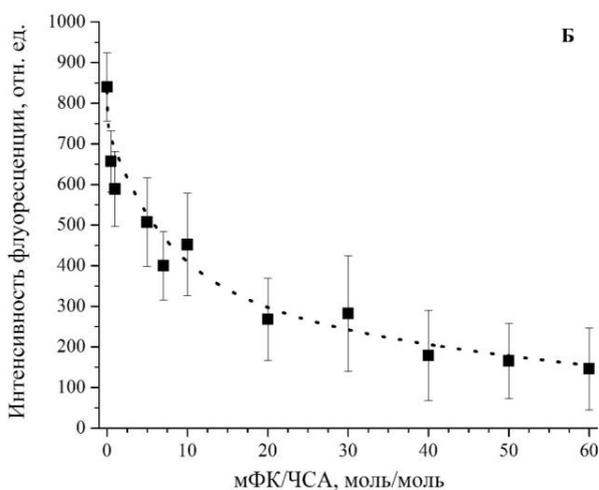
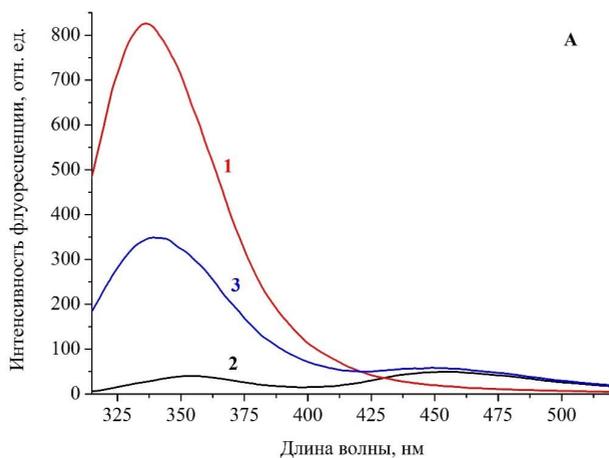


Рис. 2. *a* — Спектры флуоресценции ($\lambda_{ex}=295$ нм) образцов: ЧСА (1), мФК (2), ЧСА+мФК (3). $c(\text{ЧСА})=13,2$ мг/мл; $c(\text{мФК})=0,75$ мг/мл, разведение в 50 раз, инкубация в течение 2 часов; молярное соотношение мФК/ЧСА=7/1; *б* — Зависимость интенсивности флуоресценции ($\lambda_{ex}=295$ нм) от соотношения мФК/ЧСА, инкубация в течение 2 часов

устойчивостью при хранении (спустя неделю после начала хранения система показала образование агрегатов МНЧ, что свидетельствует о недостаточной стабильности образующегося покрытия).

Наиболее перспективной показала себя третья стратегия (способ 3), при которой к МНЧ, на поверхности которых был ранее иммобилизован ЧСА, добавлялась мФК, показана устойчивость образующегося покрытия.

Нами было протестированы различные стратегии получения наносистем на основе МНЧ, содержащих ЧСА и мФК. Наиболее перспективными показали себя системы с последовательным связыванием МНЧ с альбумином и мФК. Совокупностью методов была показана стабильность и агрегативная устойчивость данных систем, достаточная для длительного хранения систем и тестирования их в условиях *in vivo*.

Работы по созданию гибридных наносистем проводятся при финансовой поддержке за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10150, <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>.

Список литературы

1. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles // S. Laurent, C. Henoumont, D. Stanicki, S. Boutry, E. Lipani, S. Belaid, R. N. Muller, E.L. Vander. 2017. N. Md. P. 55–109.
2. Targeted Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Early Detection of Cancer: Possibilities and Challenges // Z. Bakhtiary, A. A. Saei, M. J. Hajipour, M. Raoufi, O. Vermesh, M. Mahmoudi // Nanomedicine Nanotechnology. Biol. Med. 2016 V. 12. No. 2. P. 287–307.
3. Akal Z. U., Alpsoy L., Baykal A. Superparamagnetic Iron Oxide Conjugated with Folic Acid and Carboxylated Quercetin for Chemotherapy Applications // Ceram. Int. 2016. V. 42. N. 7. P. 9065–9072.
4. Folate Receptor as a Biomarker and Therapeutic Target in Solid Tumors // O. Young, N. Ngo, L. Lin, L. Stanbery, J. F. Greeden, D. Hamouda, J. Nemunaitis // Current Problem Cancer. 2023. V. 47. P. 100917.
5. Drouet C. Biomimetic Apatite-Based Functional Nanoparticles as Promising Newcomers in Nanomedicine: Overview of 10 Years of Initiatory Research // Internal Medicine & Primary Healthcare. 2025. V. 1. N. 1. P. 1-9.
6. Folic Acid-Conjugated Carbon Dots as Green Fluorescent Probes Based on Cellular Targeting Imaging for Recognizing Cancer Cells //

X. Zhao, J. Zhang, L. Shi, M. Xian, C. Dong, S. Shuang // RSC Adv. 2017. V. 7. N. 67. P. 42159–42167.

7. Sleep D. Albumin and Its Application in Drug Delivery // Expert Opin. Drug Deliv. 2015. V. 12. N. 5. P. 793–812.

8. Albumin–Drug Interaction and Its Clinical Implication // K. Yamasaki, V. T. G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri // Biochim. Biophys. Acta — Gen. Subj. 2013. V. 1830, N. 12. P. 5435–5443.

9. Albumin-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles for Theranostics: Engineering and Long-Term In Situ Imaging // A. V. Bychkova, M. N. Yakunina, M. V. Lopukhova, Y. N. Degtyarev, M. V. Motyakin, V. S. Pokrovsky, A. L. Kovarski, M. G. Gorobets, V. M. Retivov, D. S. Khachatryan // Pharmaceutics. 2022. V. 14. N. 12. 2771.

10. The Influence of PH and Ionic Strength on the Interactions between Human Serum Albumin and Magnetic Iron Oxide Nanoparticles // A. V. Bychkova, M. V. Lopukhova, L. A. Wasserman, Y. N. Degtyarev, A. L. Kovarski, S. Chakraborti, V. A. Mitkevich // Int. J. Biol. Macromol. 2022. N. 194. P. 654–665.

УДК 615.017

Халиков К.М., Саттарова Х.Г., Очилова Н.У.
Самаркандский государственный медицинский
университет
Xulkar sattarova.xulkar@gmail.com

СОЗДАНИЕ НОВОГО МЕТОДА ЛЕЧЕНИЯ КОЖНОГО ЛЕЙШМАНИОЗА

*Впервые будет выявлено действие лечебного растительного масла *Hippórrhaë rhamnóides*, определено действие настоя лекарственного растения *Herba Pegani harmalae* и действие медицинского озона на лейшманиозные язвы. На основе свойств масла лекарственного растения *Hippórrhaë rhamnóides* обогащенное лекарственным озоном и настоем лекарственных растений *Herba Pegani harmalae* будет создан противолейшманиозный лекарственный препарат. Благодаря использованию нового препарата будет достигнуто заживление лейшманиозных язв в краткие сроки. Клиническими, морфологическими и иммунологическими исследованиями будет доказана эффективность нового препарата.*

Ключевые слова: *кожный лейшманиоз, амастиготы, микроскопия, диагностика, иммунитет, интерлейкины, медицинский озон, масла лекарственных растений, антипаразитарное действие.*

*Halikov K.M., Sattarova H.G., Ochilova N.U.
Samarkand State Medical University*

CREATION OF A NEW METHOD FOR TREATING CUTANEOUS LEISHMANIASIS

For the first time, the effect of the medicinal vegetable oil Hippophaë rhamnóides will be revealed, the effect of the infusion of the medicinal plant Herba Pegani harmalae and the effect of medical ozone on leishmania ulcers will be determined. Based on the properties of the oil of the medicinal plant Hippophaë rhamnóides, enriched with medicinal ozone and tincture of medicinal plants Herba Pegani harmalae, an antileishmanial drug will be created. Thanks to the use of the new drug, healing of leishmaniasis ulcers will be achieved in a short time. Clinical, morphological and immunological studies will prove the effectiveness of the new drug.

Keywords: *cutaneous leishmaniasis, amastigotes, microscopy, diagnostics, immunity, interleukins, medical ozone, medicinal plant oils, antiparasitic effect.*

Введение. Узбекистан расположен в одном из эндемичных по кожному лейшманиозу регионах мира. Кожные лейшманиозы относятся к вновь возвращающимся заболеваниям. Во всем мире отмечается рост заболеваемости, в том числе и в Узбекистане (ВОЗ, 2020). В республике распространены два вида кожных лейшманиозов зоонозный и антропонозный. Возбудителем зоонозного является внутриклеточный паразит — *Leishmania major*. Антропонозный вызывается *Leishmania tropica*. Заболевание протекает с образованием долго незаживающих язв — от 8 до 16 месяцев, которые часто инфицируются. Заболевание заканчивается образованием деформирующих и обезображивающих рубцов. Лечение кожных лейшманиозов представляет определенные трудности. Во всем мире применяется инъекции стибоглюконата натрия в пораженный участок, данное лечение недоступно в США и России. Вариантами местного лечения являются тепловая терапия, которая требует специальных условий для выполнения, и криотерапия. Данные методы лечения являются болезненным и применяются только для лечения небольшого поражения. Используются местные препараты с паромомицином в виде мази, содержащей 15% паромомицина и 12% метил бензэтония хлорида. В ряде стран применяются препараты 5 валентной сурьмы. Указанные методы лечения вызывают большое количество осложнений и имеют противопоказания, а также способствуют развития

резистентных штаммов паразита. Кроме того, все перечисленные препараты не зарегистрированы в Узбекистане. В качестве альтернативных методов лечения могут послужить использование отваров и масел лекарственных растений, произрастающих в Узбекистане, барботированных медицинским озоном.

Исследованиями авторитетных авторов доказаны окислительные, дезинфицирующие и бактерицидные свойства медицинского озона (Чекман И.С. и др., 2013). При высоких концентрациях озона (10–100 мг/л) проявляются его бактерицидные, фунгицидные, вирусцидные свойства. Низкие концентрации озона (0,5–5 мг/л) способствуют эпителизации и заживлению раневой поверхности, стабилизации клеточных мембран (Яшанова М.И. и др. 2019). Известно, что препараты на основе растения *Herba Pegani harmalae* (гармалы) обладают бактерицидными, инсектицидными и ранозаживляющими свойствами. Отвар и тинктура растения используются в виде болеутоляющего и успокоительного препарата, при простуде, а также в виде антисептического средства (Бердимухамедов Г., 2009). Плоды облепихи, благодаря наличию фенольных соединений, органических кислот и других биологически активных веществ относят к функциональным, адаптогенным средствам, обладают выраженными антиоксидантными, антистрессовыми, антитромбозными, ранозаживляющими, противоопухолевыми свойствами (Саидов С.А. 2020).

Таким образом, исследования направленные на разработку лечебных препаратов от кожного лейшманиоза, основанных на применении лечебных свойств лекарственных растений и медицинского озона являются актуальными.

Впервые будет получен лекарственный препарат для лечения кожных лейшманиозов на основе свойств масел лекарственных растений барботированных медицинским озоном. Получение противолейшманиозного препарата позволит улучшить результаты лечения кожных лейшманиозов и исключить импортирование дорогостоящих зарубежных препаратов.

Цель. Настоящее исследование будет посвящено разработке лекарственного препарата для лечения кожного лейшманиоза (КЛ) на основе масел лекарственных растений барботированных медицинским озоном.

Методы исследования. В исследовании использовались клинические и морфологические методы исследования.

Результаты. Ретроспективно изучены косметические последствия перенесенного КЛ, выявлены методы лечения КЛ в Сурхандарьинской и Жиззакской областях. Получены результаты общеклинических исследований более 100 больных с зоонозным и антропонозным КЛ с выявлением отклонений в лабораторных показателях.

Больные разделены на группы. Первой группе больных (50 человек) для лечения КЛ было применено облепиховое масло, в виде асептической повязки. Второй группе больных было применено обдувание раны сухой озono-кислородной смесью в дозировках от 3 до 8 мг/литр/мин в течение 5 минут 2 раза в день. Третьей группе больных для асептической обработки был использован отвар травы Гармала. Четвертая группа больных лечилась облепихового масла с помощью озонатора и наносила на лейшманиозные раны. Для мониторинга обсеменности язв лейшманиями до лечения на 1, 3, 7, 15, 20-е сутки проводились микроскопические исследования препаратов, полученных из лейшманиозных язв).

Результаты показали, что в четвертой группе больных заживление ран происходило быстрее и без рубцов, чем в других группах. При лечении четвертой группы больных добавление к лечению травы Гармала ускорило эпителизацию ран (рис. 1 и 2).



Рис. 1. Фото больной: *а* — до лечения, *б* — после лечения



а

б

Рис. 2. Фото больной: *а* — до лечения, *б* — после лечения

Определены результаты воздействия на лейшманиозные раны облепихового масла, отвара травы Гармала и сухой озоно-кислородной смеси. Определена наиболее эффективная концентрация озона.

Мониторировалась обсеменность язв лейшманиями. Фиксировались сроки начала регресса обсеменности, появления грануляционной ткани и эпителизации. Оценены результаты рубцевания и косметический результат.

На основе анализа полученных результатов определена оптимальная концентрация озона в барботированном облепиховом масле, сроки и кратность применения препарата. Клиническое течение процесса рубцевания лейшманиозной язвы фиксировались и документировались путем фотографирования.

Вывод. В заключение можно сказать, что лечение озонированным оливковым маслом и травой Гармала очень эффективно при лечении кожных поражений лейшманиозом. Эпителизация ран происходит быстро при лечении таким способом. Раны заживают без рубцов.

Список литературы

1. Абдиев Т.А., Саидахмедова Д.Б., Сувонкулов У.Т., Ахмедова М.Д. Паразитарные болезни человека в Узбекистане. Методическое руководство. 2018. С. 67.
2. Сувонкулов У.Т., Ачилова О.Д., Муратов Т.И. Этиология кожных лейшманиозов в эндемичных регионах Узбекистана на примере Джизакской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2019. Т. 24, № 3. С. 123-127.
3. Ахмедова М.Д., Анваров Ж.А., Сувонкулов У.Т., Мирзажонов Д.Б., Осипова С.О. Кожный лейшманиоз и сопутствующие тканевые гельминтозы // Журнал инфектологии 2019. Т. 11, № 2. С. 20–25.
4. Achilova O.D., Tai-Soon Yong, Suvonkulov U.T. Species diversity of mosquito-carriers leishmaniasis in the modern ecosystem of Uzbekistan // Material of conf «New Horizons in Harmful organism science» 24 Apr. 2019 Busan. The Republic of Korea. P. 64-65.
5. Ахмедова М.Д., Ташпулатова Ш.А., Анваров Ж.А., Сувонкулов У.Т. Кожный лейшманиоз // Учебно-методическое пособие. Ташкент, 2019. С. 220.
6. Сувонкулов У.Т., Муратов Т.И., Ачилова О.Д. Комплексный подход к лечению кожных лейшманиозов // Материалы научно-практической конференции «Инфекция, иммунитет и фармакология». Ташкент, 2019. С. 219-225.
7. Эпидемиология, этиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика кожных лейшманиозов. Методические рекомендации. Ташкент, 2020. 21 с.
8. Сувонкулов У.Т., Муратов Т.И., Баратова М. Р., Исламов Н.Х., Саламова Л.А., Орипов Р.А., Мамиров В.А. Распространенность кожных лейшманиозов среди населения в эндемичных районах Узбекистана // Society and innovations. 2020. Вып. 1 №1/S. С. 225-228.
9. Ахмедова М.Д., Сувонкулов У.Т., Мирзажонина Д.Б., Анваров Ж.А. Retrospective epidemiological analysis of cutaneous leishmaniasis incidence in the Republic of Uzbekistan // Tibbiyotda Yangi kun 3 (31) son 2020. 23-25 бет.
10. Сувонкулов У.Т., Аширов З.Ф., Абдуллаев Д.М., Тошев С.У., Абдуллаев Х.Д. Встречаемость кожных лейшманиозов в эндемических районах // Проблемы биологии и медицины самарканд 2020. № 1.1 (126).

УДК 615.273

*Циммер И.А.¹, Гордеев К.В.², Погуляй Ю.А.³,
Галенко-Ярошевский П.А.⁴,
Доценко В.В.⁵*

*^{1,2,3,4}Кубанский государственный медицинский университет
⁵ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»,
Краснодар
iamzimmer@mail.ru;
gordeev.kirill.loremipsum@gmail.com;
yu.pogulyai@yandex.ru*

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ПРОИЗВОДНЫХ
N-АЦЕТИЛИРОВАННЫХ 5-АМИНО-1,2,4-ТРИАЗОЛОВ
КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ФАКТОРОВ
СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ XIII**

Сердечно-сосудистые заболевания, фактором развития которых является тромбоз, возглавляют список причин смертности во всем мире. В настоящей работе представлены результаты скрининга и компьютерного моделирования инновационных ингибиторов факторов свертывания крови, участвующих во внутреннем пути коагуляции.

***Ключевые слова:** факторы свертывания крови, антикоагулянты, молекулярный докинг, фактор Хагемана, ингибиторы факторов свертывания крови.*

*Zimmer I. A.¹, Gordeev K. V.², Poguliyai Y.A.³,
Galenko-Yaroshevskiy P. A.⁴, Dotsenko V. V.⁵
^{1,2,3,4}Kuban State Medical University,
⁵Kuban State University
Krasnodar*

**MOLECULAR DOCKING OF N-ACETYLATED 5-AMINO-1,2,4-
TRIAZOLES AS POTENT BLOOD COAGULATION
FACTOR XIII INHIBITORS**

Cardiovascular diseases mainly caused with thrombosis head the list of mortality causes around the world. In the present survey, the results of virtual screening and computer modeling of new inhibitors targeted on blood coagulation factors participating in the intrinsic pathway are shown.

***Keywords:** blood coagulation factors, anticoagulants, molecular docking, Hageman factor, blood coagulation factors inhibitors.*

Введение. Как известно, нарушения в системе свертывания крови являются наиболее распространенной причиной мировой смертности. Тромботические осложнения являют собой большую проблему в различных областях медицины, включая кардиологию, онкологию, гематологию и иммунологию [1]. В настоящее время активно разрабатываются соединения, направленные на ингибирование различных ферментов каскада свертывания крови. Наиболее перспективными мишенями в данном случае можно однозначно считать факторы XIIa и XIa ввиду их участия лишь во внутреннем пути каскада свертывания крови, что потенциально позволяет избежать главного побочного эффекта всех существующих антикоагулянтов, используемых в клинической практике — спонтанного кровотечения, при чем если ингибиторы FXIa могут стать безопасной заменой НОАК с селективной анти-FXa активностью (риваро- и аписабан), то ингибиторы FXIIa позволят решить больший спектр проблем клинической медицины и терапии, что детерминировано биологическим полифункционалом фермента [2]. Установлено, что FXIIa имеет пять субстратов: FXIa, ВМК, прекалликреин, плазминоген и белки системы комплемента (C1q и C1r) и потому участвует в тонком регулировании не только гемокоагуляции, но и иммунного ответа [3].

В последнее время рассматривается обширный круг молекулярных платформ, способных служить ядром при молекулярном дизайне малых молекул — ингибиторов FXIIa [2]. Среди них особого внимания заслуживают производные N-ацетилированных 5-амино-1,2,4-триазолов ввиду описанного в литературе ингибирования FXIa [5,6]. Известны различные пути синтеза описанных производных [5-7]. К примеру, бензгидразид на первом этапе вступает в реакцию с сульфатом S-метилтиоурония (EtOH / H₂O 1 : 1, кипячение, 16 ч). Продукт реакции, N-бензоилгуанидин, циклизуется под действием 40% NaOH (кипячение, 2 ч) с выходом 57%. Полученный 5-амино-3-фенил-1H-1,2,4-триазол реагирует с бензоилхлоридом в ТГФ и пиридине (1:1, 0 °C → 25 °C, 3 ч) с образованием 1-бензоильного производного с выходом 92% [5] (рис. 1).

Существует обширный *in silico* инструментарий для выявления качественных и количественных параметров зависимости «структура-активность» (SAR). Метод виртуального скрининга широко применяется в качестве первичного метода селекции при разработке лекарственных средств, позволяя значительно снизить затраты

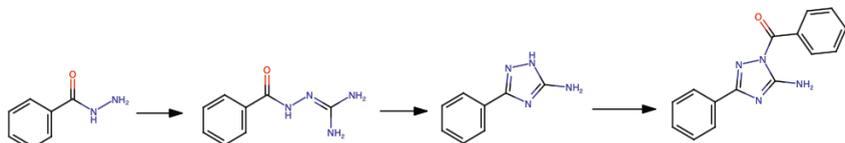


Рис. 1. Одна из схем синтеза производного N-ацетилированных 5-амино-1,2,4-триазолов

на фармацевтическую разработку лекарственных веществ, при этом значительно повышая ее эффективность [8, 9]. Однако, наиболее информативен структурный подход, подразумевающий фармакофорный анализ и оценку межмолекулярных взаимодействий. Последнее реализуется посредством молекулярного докинга.

Таким образом, поиск новых лекарственных веществ, способных предотвращать патологические состояния без нарушения нормального гемостаза, является актуальной задачей в настоящее время, а реализация этой задачи возможна путем использования современных методов *in silico*.

Цель исследования. Поиск потенциальных ингибиторов фактора свертывания крови FXIIa с помощью виртуального скрининга баз данных низкомолекулярных органических соединений методами молекулярного докинга, а также молекулярное моделирование *de novo*.

Материалы и методы. В качестве лигандов были использованы соединения, представляющие собой производные N-ацетилированных 5-амино-1,2,4-триазолов, которые были отобраны из библиотеки PubChem путем отсеивающего поиска по соответствующей SMARTS-структуре (рис. 2). Структуры были оптимизированы средствами молекулярной механики в силовом поле UFF с использованием программного пакета Avogadro 1.2.0. Первичный скрининг полученных лигандов осуществляли с помощью Molegro Virtual Docker версии 6.0, используя проприетарный режим виртуального скрининга (at least top 10%). Молекулярная мишень представляла собой фактор свертывания крови FXIIa, трехмерная структура которого была получена из Protein Data Bank (PDB ID 6B74). Подготовки биомишени осуществлялась стандартными методами пакета Molegro. В качестве области молекулярного докинга использовали область каталитической триады, включающей аминокислоты Ser195, His57, Asp102 (по координатам X: 62,8 Y: -1,5 Z: 14).

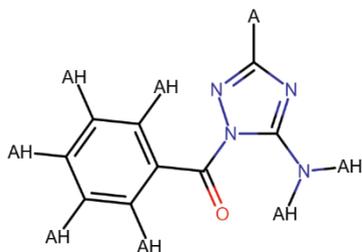


Рис. 2. Скаффолд SMARTS-структуры

При разработке *de novo* анализу подвергались полученные с использованием Molegro Virtual Docker данные о наиболее выгодном пространственном положении лиганда в сайте связывания при использовании алгоритма MolDock SE и скоринг-функций MolDock Score и HBond.

Результаты. На первом этапе исследования было отобрано 217 структур, по результатам скрининга была составлена библиотека на 25 соединений (табл. 1). Из них в дальнейшем было выделено 13 наиболее перспективных с точки зрения современной медицинской химии структур, для которых была повторно произведена процедура молекулярного докинга по отношению к заданной мишени в 40 итерациях. Результаты молекулярного докинга были подвергнуты системному анализу с целью дальнейших изысканий структур ингибиторов *de novo*.

CID	140736720	140736631	140736578
Структурная формула			
MolDock Score	-210.315	-208.785	-203.367

Рис. 3. Лиганды, обладающие наибольшим аффинитетом согласно результатам виртуального скрининга.

Таблица 1. Результаты первичного скрининга

№	Ligand CID	MolDock Score	HBond	Site (HBond only)
1	140736720	-210.315	-5.5184	Tyr99 Ser214 Val227 Tyr228
2	140736631	-208.785	-16.599	Cys58 Asp189 Gln192 Ser195 Gly216 Gly219
3	140736578	-203.367	-17.299	Phe41 Cys58 His143 Ala190 Gln192 Ser195 Gly219
4	51362842	-201.305	-6.2767	Ser195 Ser214 Tyr228
5	140736459	-200.496	-11.181	Gln192 Ser195 Gly219
6	71543719	-198.436	-4.8348	Ser195 Gly219
7	71543720	-197.484	-4.9109	Ser195 Gly219
8	153956375	-195.734	-5.5844	Phe41 Asp189 Ser195
9	133081414	-194.146	-2.1034	Tyr99 Ser195 Gly219
10	153956388	-191.167	-9.3343	Asp189 Ser195 Ser214 Gly216 Tyr228
11	140736426	-190.341	-4.6341	Gly193 Ser195 Gly219
12	153956390	-190.124	-5.9359	Ser214 Trp215
13	140736714	-187.894	-8.2260	Ser214 Trp215 Gly216 Tyr228
14	71544032	-187.287	-5.6618	Ser195 Gly219
15	140736541	-186.852	-7.4490	Phe41 Cys58 Ser195
16	140736648	-186.793	-9.6742	Gly193 Ser195 Ser214 Trp215 Tyr228
17	11497699	-186.011	-4.201	Val97 Gly219
18	122506933	-185.035	-7.0505	His143 Gln192 Ser195
19	153956376	-184.072	-6.2101	Ser214 Trp215 Gly219 Tyr228
20	2983873	-182.541	-5.4339	Ser195 Ser214 Tyr228
21	2984491	-182.417	-2.5634	Tyr151 Gly193 Ser195
22	140736457	-182.334	-9.0278	Gly146 Tyr151 Gly193 Ser195 Ser214 Trp215 Tyr228
23	140736527	-182.164	-6.3309	His143 Gln192 Ser195
24	122506922	-181.66	-2.2400	Ser195
25	122506879	-181.078	-4.0876	Phe41 Ser195

Особый интерес для стерически детерминированной селективности в отношении FXIIa представляет карман, сформированный аминокислотными остатками Ala190, Ile213, Trp215 и Val227. Стерически выгодным билдинг-блоком был выявлен фенильный заместитель, замещенный в *мета*-положении либо CF₃-, либо CH₃O-группой. MolDock Score для полученных de novo соединений с вышеука-

занными заместителями составил -187.552 и -190.444 соответственно. Отличительные свойства лигандов *de novo*: молекулярная масса, не превышающая 500 Да, отсутствие имидных и сульфонамидных группировок.

Выводы. Таким образом, были выявлены фармакофорные детерминанты и созданы компьютерные модели биологически активных лигандов, в отношении которых была подтверждена селективность связывания фактора свертывания крови FXIIa. В связи с этим рекомендуется дальнейшее проведение фармакологических исследований предложенных веществ.

Список литературы

1. Подоплелова Н.А. Свертывание крови в XXI веке: новые знания, методы и перспективы для терапии / Н.А. Подоплелова, В.Б. Сулимов, А.С. Тащилова и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020. №19. С.139-157.
2. Tashchilova A. et al. New Blood Coagulation Factor XIIa Inhibitors: Molecular Modeling, Synthesis, and Experimental Confirmation // Molecules. 2022. 27. № 4. P. 1234.
3. Wagenman B. L. et al. The Laboratory Approach to Inherited and Acquired Coagulation Factor Deficiencies // Clinics in Laboratory Medicine. 2009. 29. № 2. P. 229–252.
4. Davoine C. et al. Factor XII/XIIa inhibitors: Their discovery, development, and potential indications // European Journal of Medicinal Chemistry. 2020. 208. P. 112753.
5. Korff M. et al. Acylated 1 H -1,2,4-Triazol-5-amines Targeting Human Coagulation Factor XIIa and Thrombin: Conventional and Microscale Synthesis, Anticoagulant Properties, and Mechanism of Action // J. Med. Chem. 2020. 63. № 21. P. 131–139.
6. Chen C. et al. 1-Alkyl-3-amino-5-aryl-1H-[1,2,4]triazoles: novel synthesis via cyclization of N-Acyl-S-methylisothiourreas with alkylhydrazines and their potent corticotropin-Releasing factor-1 (CRF1) receptor antagonist activities // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2001. 11. № 24. P. 3165–3168.
7. Imberg L. et al. Amide-functionalized 1,2,4-Triazol-5-amines as Covalent Inhibitors of Blood Coagulation Factor XIIa and Thrombin // ACS Pharmacol. Transl. Sci. 2022. 5. № 12. P. 1318–1347.
8. Coumar M. S. Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design: Fundamentals, Techniques, Resources and Applications. : Academic Press, 2021. 522 с.

9. Свитанько И.В. Моделирование в направленном синтезе веществ с заданными свойствами: автореф. дис. ... д-ра наук., . М.: ИОХ РАН, 2018.

УДК 57

*Челышева Л. А., Нониашвили Е. М., Паткин Е.Л.
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург
ofeliyafutman@gmail.com*

БИСФЕНОЛ А ПРИВОДИТ К ОБЩЕГЕНОМНОМУ УМЕНЬШЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ H3K27me2-МАРКЕРА ТРАНСКРИПЦИОННО НЕАКТИВНОГО ХРОМАТИНА В ЯДРАХ БЛАСТОМЕРОВ 2-КЛЕТОЧНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШЕЙ *IN VITRO*

*Проведено количественное определение *in situ* общегеномного содержания маркера транскрипционно-неактивного хроматина H3K27me2. Анализ эпигеномного статуса зародышей проводили через 24 часа культивирования в среде, содержащей 50 мкМ БФА путем измерения интенсивности флуоресценции антител к H3K27me2 для всех интерфазных ядер бластомеров 2-кл зародышей мыши.*

Ключевые слова: 2-кл зародыши мыши; бисфенол А; H3K27me2.

*Chelysheva L.A., Noniashvili E.M., Patkin E.L.
Institute of Experimental Medicine of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg*

BISPHENOL A LEADS TO A GENOME-WIDE DECREASE IN THE CONTENT OF H3K27me2, A MARKER OF TRANSCRIPTIONALLY INACTIVE CHROMATIN, IN THE NUCLEI OF BLASTOMERES OF 2-CELL MOUSE EMBRYOS *IN VITRO*

*Quantitative *in situ* determination of the genome-wide content of the transcriptionally inactive chromatin marker H3K27me2 was carried out. Analysis of the epigenomic status of the embryos was carried out after 24 hours of cultivation in a medium containing 50 μM BPA by measuring the fluorescence intensity of antibodies to H3K27me2 for all interphase nuclei of blastomeres of 2-cell mouse embryos.*

Keywords: 2-cell mouse embryos; bisphenol A; H3K27me2.

Введение. Известно, что токсин бисфенол А (БФА), содержащийся в пластиковых предметах обихода человека, негативно влияет на основные эпигенетические маркеры — метилирование ДНК и модификации гистонов [1]. Одним из ключевых маркеров транскрипционно неактивного хроматина является модификация H3K27me2. Ранее нашей группой в исследовании Нониашвили и соавт. было по-

казано, что введение малых доз БФА способно нарушать процессы перепрограммирования генома, связанные с метилированием ДНК, происходящие в раннем эмбриогенезе [2]. В настоящее время мало публикаций, посвященных исследованию влияния БФА на модификации гистонов. В данной работе в качестве маркера эффекта была выбрана репрессивная гистоновая модификация H3K27me₂, которая является меткой Polycomb-зависимого гетерохроматина, необходимого для нормального эмбрионального развития млекопитающих. В качестве модели были выбраны 2-клеточные зародыши мышей, поскольку на этой стадии происходит процесс начальной гетерохроматинизации.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния БФА на данный маркер в ядрах бластомеров 2-клеточных зародышей мышей.

Материалы и методы. Одноклеточные эмбрионы (зиготы) получали от половозрелых самок мышей гибридов F1 (C57BLX SWA) из питомника «Рапполово» после гормональной стимуляции и спаривания их с самцами [1]. Все зиготы, извлеченные из яйцеводов под контролем бинокулярной лупы делили на две группы и помещали в культуральную среду M16 (Sigma): первая группа контрольная — интактная среда M16, во второй группе («БФА») в среду добавляли 50 мкМ спиртового раствора БФА (Sigma-Aldrich). Зародыши в каплях среды под силиконовым маслом культивировали в атмосфере 5% CO₂ в воздухе течение 24 часов. Из всех зародышей, достигнувших 2-клеточной стадии, готовили препараты для иммуноцитохимического окрашивания [3]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ был выполнен с использованием программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Prism 9 Software, Inc.).

Результаты и обсуждение. В работе исследовано 122 ядра бластомеров (62 — в контрольной группе, 60 — в группе «БФА») 2-клеточных эмбрионов мыши. Результаты проведенного иммуноцитохимического анализа указывают на то, что воздействие БФА в предимплантационном периоде приводит к общегеномному **снижению** (в 1,3 раза) количества репрессивных модификаций гистонов H3K27me₂ по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

В медико-биологических базах данных, встречаются единичные работы, посвященные исследованию влияния БФА на модификации гистонов. В исследовании Prokešová et al, проведенного с использованием альтернативного бисфенола — бисфенола S, было

продемонстрировано увеличение содержания H3K27me2 в незрелых ооцитах [4].

Таким образом, наши результаты *in situ* продемонстрировали, что воздействие БФА в период доимплантационного развития зародышей нарушает процесс гетерохроматинизации, необходимый для их последующей дифференцировки. Полученные данные указывают на то, что действительно доимплантационное развитие является чувствительным периодом к воздействию БФА, что, наиболее вероятно, обусловлено активными процессами перепрограммирования, связанными с эпигенетическими и эпигеномными модификациями.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ: НИР № FGWG-2022-0012 (рег. № НИОКТР 122020300196-4).

Список литературы

1. Golub M.S., Wu K.L., Kaufman F.L. et al. Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure // *Birth Defects Res. (Part B)*. 2010. Vol. 89. P. 441-466.
2. Нониашвили Е.М., Грудинина Н.А., Кустова М.Е., и др. Метилирование ДНК в раннем эмбриогенезе мышей под влиянием бисфенола А // *Экологическая генетика*. 2017. Т. 15. № 3. С. 42–53.
3. Deng M., Chen B., Liu Z. et al. Exchanges of histone methylation and variants during mouse zygotic genome activation // *Zygote*. 2020. Vol. 28(1). P. 51-58.
4. Prokešová Š., Ghaibour K., Liška F et al. Acute low-dose bisphenol S exposure affects mouse oocyte quality // *Reprod Toxicol*. 2020. Vol. 93. P. 19-27.

Технический редактор: Т.Н. Ефимова

Подписано в печать 30.11.2023 г. Формат бумаги 60×84/16.
Уч.-изд. л. 11,8. Усл. печ. л. 16,5. Заказ № 315 (1).

Санкт-Петербург, Издательство
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России
191015, Санкт-Петербург, Кирочная ул., д. 41.

Отпечатано в типографии
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России
191015, Санкт-Петербург, Кирочная ул., д. 41.