

Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П.Павлова



Научная конференция

АНАЛИТИКА КАК ИНСТРУМЕНТ КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

26-27 апреля 2011

Санкт-Петербург
2011



РОЛЬ МЕТОДОВ МЕТАБОЛОМНОГО И ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ И АНАЛИЗА ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И ПРОДВИЖЕНИИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВ

Проф. А.А. Жлоба, проф. Т.Ф. Субботина

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад.
И.П.Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197022,
Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8, корпус 3, Отдел биохимии НИЦ
Zhloba@mail.spbnit.ru

Современные технологии метаболомного и протеомного скрининга не только значительно повышают эффективность диагностики заболеваний, но и резко увеличивают пропускную способность лабораторно-диагностических центров при массовых обследованиях. К настоящему времени на рынке лабораторных аналитических технологий имеются предложения в области перинатального обследования, неонатального скрининга. Большой диагностической эффективностью обладает метаблическое профилирование в группах риска, включая группы с повышенным риском неблагоприятного прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний, а также скрининговые обследования у лиц старшей возрастной группы.

Рутинные анализы практически используют не более 1% метаболома для диагностических целей. Всего метаболом человека включает около 3000 метаболитов, немного больше пищевых компонентов, а также около полутора тысяч лекарственных субстанций. Для дирижирования данным метаболомом используется примерно 20 тысяч единиц генома и 6-7 миллионов протеома. Клиническая биохимия достаточно консервативна в отношении расширения набора тестов, не только по принципу достаточной информативности ограниченного числа тестов. Важно было, до настоящего времени, учитывать увеличение затрат с внедрением каждого нового теста. Развивающиеся технологии, не приводят к увеличению стоимости анализа с расширением интерпретируемого спектра метаболитов. Это техники ядерно-

магниторезонансной спектроскопии (ЯМРС) с пределом количественной оценки в биоматериале около 0,1 мкМ и tandemной масс-спектрометрии (МС), обладающей большой пропускной способностью в отношении числа метаболитов и высокой чувствительностью вплоть до 1 пМ. Эти методы могут выполняться очень быстро и могут считаться скрининговыми способами обследования населения. В отношении хроматографии, совмещенной с МС, в настоящее время стоит задача выбора набора метаболомных маркеров из разных химических классов органических соединений, опираясь на которые, можно не только зарегистрировать устойчивые сдвиги метаболизма, но что и является конечной целью, определить тип, глубину, стадию патологического процесса, его обратимость. Имеется возможность по начинающимся едва-различимым сдвигам предсказывать зарождение и ожидаемый темп развития патологического процесса в различных условиях.

Широкий набор маркеров (тотальный метаболом) при скрининге больших когорт мешает обработке данных. В настоящее время развивают подходы к селекции маркеров. Для некоторого облегчения выбора маркеров можно пользоваться современными программами, в которых представлены сведения от генома, через протеом к метаболому человека. Очень перспективны для построения диагностических алгоритмов эмпирические данные относительно связи метаболомных изменений и патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний. Для выбора групп метаболомных маркеров при скрининге сердечно-сосудистых заболеваний, приводящих к исходам в виде тромбозов, инфаркта и инсульта, следует опираться на уже изученные патохимические процессы. К ним относятся - гипометилирование, митохондриальная и эндотелиальная дисфункция, нарушение анаплеротических путей цикла трикарбоновых кислот и путей биосинтеза и транспорта липидов. Следует также принимать во внимание хорошо изученные эндокринные маркеры, которые в совокупности, входят в 48 известных профилей метаболомных групп. Выбор процедуры пробоподготовки и субстанций для калибровки анализа зависит от конечного списка маркеров из указанных групп.

В области изучения и продвижения лекарств проведение работ невозможно без оснащения лабораторий tandemными масс-спектрометрами в сочетании с

различными видами хроматографического разделения пробы. Весьма важны также методы преаналитической подготовки пробы биологического материала и автоматизированные способы экстракции целевых аналитов из сложной матрицы. Это позволяет обеспечить неклиническую или доклиническую фазу испытаний фармакологических субстанций современными *in vitro* и *in vivo* лабораторными тестами.

При членстве в ВТО требования к разработчикам лекарств, так называемые, правила GLP носят обязательный характер. Good Laboratory Practice (GLP)- в переводе означает надлежащая лабораторная практика. Соблюдение этих правил при продвижении лекарств гарантирует их высокое качество. Аналитический центр коллективного пользования с применением различных хроматографических методов, включая тандемную масс-спектрометрию (МС/МС), гарантирует выполнение этих правил. Каковы же возможные направления деятельности такого аналитического центра в составе «Научно-образовательного комплекса»?

Это направления научных и прикладных исследований:

1. Исследования *in vitro* биологически активных субстанций с целью выявления их полезных свойств для лечения заболеваний человека и животных в соответствии с международным стандартом GLP (Good Laboratory Practice) и изучение их фармакологического действия.
2. Участие в разработке новых лекарственных препаратов и лабораторных технологий их получения.
3. Изучение молекулярных механизмов действия субстанций в модельных условиях *in vitro*, взаимосвязи их структуры и функции.
4. Изучение метаболизма в условиях действия фармакологических субстанций.
5. Продвижение в образовательные стандарты новых данных о биологически-активных субстанциях.
6. Изучение взаимодействия фармакологической субстанции и матрицы исследуемого биологического образца в ходе хранения и пробоподготовки материала

7. Подготовка материалов для учебных целей и участие в преподавании по направлению: «Лабораторные исследования при разработке и испытаниях лекарств».

При испытаниях лекарств в Центре в обязательном порядке также проводят:

- фармакокинетические исследования, а также изучают -
- всасывание,
- выделение,
- метаболизм,
- биодоступность.

Кроме того, дополнительно требуется оборудование для тестирования состояния здоровья организма, участвующего на различных стадиях в испытаниях. На доклинических - требуется изучать биологический материал животных на приборах специализированных для материала животных.

В нашем городе в настоящее время технологии метаболомного и протеомного профилирования, начинают развиваться в некоторых крупных медицинских центрах, однако темпы этого развития следует поддержать регионарными инвестиционными проектами.

Работы молодых ученых на ежегодной конференции Отдела биохимии 2011 года отражают современные тенденции развития клинической химии, актуальные вопросы мониторинга состояния организма и биохимии спорта.

И.А. Родин, И.А. Ананьева

СОВРЕМЕННАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ И ЕЁ ВОЗМОЖНОСТИ В ОБЛАСТИ БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЫ И ФАРМАКОЛОГИИ

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Rodin@analyt.chem.msu.ru

В докладе рассмотрены основные достижения и тенденции последних лет в области органической масс-спектрометрии. Проведен сравнительный анализ основных современных методов ионизации (электрораспылительная ионизация (электроспрей), матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (*MALDI*), прямой анализ в реальном времени (*DART*), десорбционная электрораспылительная ионизация (*DESI*)) и масс-анализаторов (квадрупольные, квадрупольные ионные ловушки, времяпролетные, орбитальная ионная ловушка (*OrbiTrap*)), используемых для исследования малых молекул и биополимеров. Представлены основные подходы к количественному и качественному анализу важных классов соединений.

Описаны возможности метода для решения ряда практически важных задач:

- быстрый скрининг нарушений метаболизма
- быстрая идентификация микроорганизмов и вирусов
- масс-спектрометрический имейджинг
- исследования метаболизма лекарственных средств.

Тезисы докладов молодых ученых и студентов (приведены в редакции авторов без правок оргкомитета конференции).

Авторы научных работ могут обсудить полученные ими результаты со всеми желающими при обращении к ним во время проведения конференции и путем переписки по электронной почте. Адреса авторов приведены после заголовка работы.

А. О. Безушко

ОПТИМИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА ОКСИДА АЗОТА (II) В ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЙ СИСТЕМЕ

(научные руководители: д.х.н., проф. А. А. Карцова, д.м.н., проф. А. А. Жлоба)

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра органической химии

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет, отдел биохимии НИЦ

nw-e005@mail.ru

Лабораторно-диагностические методики оценки уровня продуктов *NO*-синтазных реакций используют в практике в диагностическом процессе при заболеваниях легких, тестируя выдыхаемую газовую смесь или ее конденсат. Эти методики остаются очень трудоемкими и дорогостоящими. Оценка уровня собственно оксида азота (*NO*) относится к наиболее актуальным аналитическим проблемам, так как это свободно-радикальное соединение весьма нестабильно и быстро окисляется до высших окислов азота. В литературе отсутствуют способы оценки оксида азота в выдыхаемых пробах с помощью химических ловушек, к которым относится флуоресцентный индикатор оксида азота - *DAF-2*.

Цель работы заключалась в оптимизации условий регистрации *NO* с помощью флуоресцентного индикатора *DAF-2* в проточно-инжекционной системе с флуориметрическим детектированием. Отдельная задача состояла в разработке методики калибровки аналитического метода модельными растворами, содержащими известные количества донатора оксида азота в виде определенного нитрозотиола.

В ходе исследования решены следующие задачи:

1. Оптимизированы условия синтеза и контроль выхода нитрозотиола в целях калибровки анализа.
2. Изучены условия декомпозиции модельных растворов нитрозотиолов и их декомпозиция в образцах плазмы крови.
3. Определены условия преаналитической стадии подготовки образца плазмы крови и образца конденсата выдыхаемого воздуха.
4. Предложена методика автоматизированного смешивания реакционной смеси с использованием аутоsamплера "*Agilent 1100*" (Германия) с последующей флуориметрической регистрацией продукта взаимодействия *DAF-2* с *NO*.

М.А.Власенко, И.Э. Ушал

**ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С
ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ
БИОЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА У РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП НАСЕЛЕНИЯ**

(научные руководители - д.м.н., проф. И.И. Шантырь, д.м.н., С.В. Дударенко)

ФГУЗ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС
России», Санкт-Петербург
vlasenkomaria@mail.ru

С появлением новых технологий, развиваются аналитические методы, позволяющие с высокой точностью оценить химический состав биологической пробы, в том числе и элементный статус объекта исследования.

Изучение элементного состава биологического материала является актуальным для практики и перспективным направлением научных исследований. На сегодняшний день накоплено достаточно материалов, посвященных биологическому действию того или иного химического элемента в различных системах живого организма, но практически нет данных по оптимальному содержанию биоэлементов в организме человека.

Изменение содержание элементов в биопробах отражается в изменении диапазонов концентрации. Для определения малых концентраций химических элементов в различных биопробах необходимо применение высокочувствительных инструментальных методов анализа. Основные требования, предъявляемые к методу, — сочетание низких пределов обнаружения, высокой чувствительности и селективности. В настоящее время для определения макро-, микро- и ультрамикроэлементов в биомедицинских образцах все большее распространение получает метод масс-спектропии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС). Данный метод является многоэлементным. Основной принцип состоит в том, что метод ИСП-МС комбинирует использование индуктивно связанной плазмы в качестве источника ионов с квадрупольным масс-спектрометром, выступающем в роли масс-анализатора, и дискретно-диодным детектором, который используется для регистрации отдельных ионов и их потоков.

На элементный состав биологических жидкостей и тканей организма может влиять ряд факторов, таких как различные биогеохимические особенности региона проживания, профессиональная деятельность, различные заболевания. Биологическое значение имеет процесс перераспределения элементов между тканями, и интенсивность их выведения из организма. Существует также множество особенностей формирования элементного статуса организма, обусловленных сложными взаимодействиями элементов друг с другом, особенностями регуляции их обмена. Корректный выбор биосубстрата и дальнейшая трактовка результатов исследования представляют непростую задачу.

Нами накоплен опыт по определению элементного состава в таких биологических средах, как волосы, ногти, кровь, моча, смешанный секрет слюнных желез различных категорий граждан.

Проведено обследование лиц участвовавших в ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС, сотрудников государственной противопожарной службы, спасателей, профессиональных спортсменов. Установлены биоэлементные особенности, связанные с характером профессиональной деятельности. Выявлены биоэлементные профили, характерные для таких патологий как остеопения, аллопеция, контактные дерматиты.

На данный момент очень активно изучаются возможности преодоления различных расстройств, связанных с дефицитом или избытком тех или иных биоэлементов определяемых методом ИСП-МС.

А. С. Гребещенко, Е. А. Кочнова, П. В. Постников

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОГО УРОВНЯ МЕНОТРОПНЫХ ГОРМОНОВ У СПОРТСМЕНОВ

(научный руководитель - к.х.н. Ю.И. Дыхал)

ФГУП «Антидопинговый центр», г.Москва

newdok@yandex.ru

При злоупотреблении спортсменами анаболическими стероидами велика вероятность нарушения работы репродуктивной системы организма. Многие анаболические стероиды обладают андрогенными свойствами и, таким образом, связываясь с рецепторами тестостерона, «обманывают» организм и нарушают цепь синтеза тестостерона: гипоталамус – гипофиз – синтез

фолликулстимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов - стимуляция рецепторов клеток Лейдига и клеток Сертоли – синтез эндогенного тестостерона, угнетая в этом ряду выработку ФСГ и ЛГ.

Во избежание этого многие спортсмены находят выход в параллельном приеме гонадотропных (менотропных) гормонов - хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), ФСГ и ЛГ. В связи с физиологическими особенностями женского организма, уровень гормонов у них не стабилен и варьируется в зависимости от фазы менструального цикла, поэтому Всемирное антидопинговое агентство (ВАДА) с недавнего времени предписывает определять эти гормоны только у спортсменов мужского пола, во избежание ложноположительных результатов. В норме ХГЧ не вырабатывается в мужском организме и определить допинг им не составляет труда, тогда как природный уровень эндогенных ЛГ и ФСГ варьируется от человека к человеку, что может привести к получению ложноположительного результата.

ФСГ и ЛГ являются продуктами передней доли гипофиза. ФСГ (фоллитропин) и ЛГ (лютропин)- гормоны гликопротеиновой природы. У мужчин ФСГ стимулирует синтез ингибина и андрогенсвязывающего белка клетками Сертоли яичек; ЛГ стимулирует интерстициальные клетки Лейдига тестикул, продуцирующих тестостерон. В норме концентрация ЛГ у мужчин составляет 1.0-14.0 мМЕ/мл, а ФСГ - 0.7-7.4 мМЕ/мл. Как показывают научные исследования, ряд процессов, происходящих в организме спортсменов, отличается от процессов, происходящих в организме обычного человека, что связано, в первую очередь, с повышенными физическими нагрузками. Это позволяет нам выделять спортсменов в отдельную группу (популяцию), показатели параметров мочи и крови которых могут отличаться от установленных норм.

Таким образом, для установления базового уровня ЛГ и ФСГ в моче спортсменов было проанализировано более 2000 образцов из различных видов спорта. В работе использовали иммуноферментные наборы «ЛГ-ИФА» и «ФСГ-ИФА» производства ООО «Диатех-ЭМ» (Москва, Россия). Кроме этого, двукратную инъекцию препарата менотропных гормонов «Менопур» (Ферринг Фармасьютикалс, Германия) вводили внутримышечно волонтеру (мужчина, 50 лет, легкоатлет). Измеряли уровни ХГЧ, ЛГ и ФСГ до инъекции и после, а также

определяли стероидный профиль образцов мочи, собранных до, во время и после инъекций. Сигнал оптической плотности регистрировали на автоматическом иммуноанализаторе ADALTIS Personal LAB (Adaltis Italia S. p. A. Italy), стероидный профиль определяли хромато-масс спектрометрическим методом. Для всех исследованных образцов мочи рассчитывали соотношение тестостерона к эпитестостерону (Т/Е) и соотношение тестостерона к лютеинизирующему гормону (Т/ЛГ). Эти параметры используют для установления факта допинга тестостероном. В настоящее время проба на тестостерон считается положительной, если соотношение $T/E \geq 4$, тогда как ряд исследований показал, что целесообразнее использовать критерий $T/ЛГ \geq 30$, так как он меньше даёт ложных результатов и показателен в течение более длительного времени. С целью установления популяционного распределения и статистически значимых интервалов проводили обработку полученных данных в программе Statistica (версия 8.0). Полученные результаты будут предоставлены ВАДА, что поспособствует установлению порогового значения концентрации ЛГ и ФСГ, после которого пробу можно считать положительной, а также уровень соотношения Т/ЛГ в исследованной популяции.

М.А. Коваленко

**ИНФОРМАТИВНОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ КРИТЕРИЕВ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ВЛИЯНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИИ
МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ**

(научный руководитель – д.м.н., проф. В.Л. Эмануэль)

Санкт-Петербургский государственный медицинский Университет им.И.П.Павлова,

Санкт-Петербург, Россия

dzhav lakh@rambler.ru

Введение. Лабораторные технологии могут верифицировать состояния предболезни. Оценка индивидуального здоровья должна рассматриваться с учетом лабораторных исследований, характеризующих состояние внешней среды обитания.

Цель: изучить связь экологических условий жизни и параметров саногенетических систем мочеобразования в сопоставимых группах из Санкт-Петербурга и жителей Заполярья.

Материалы и методы. Анализ среды обитания включало исследование водных объектов и социально-гигиенического статуса, а также изучены медико-демографические показатели населения регионов. Клинико-лабораторные технологии, использованные при обследовании 107 жителей Заполярья и 50 пациентов с клиническими проявлениями мочекаменной болезни, включали посттрансляционные отличия форм белка Тамма-Хорсфалла кристаллографической и спектрально-оптической технологией. Анализ взаимосвязей клинико-лабораторных и санитарно-гигиенических параметров проведен методами медицинской информатики – Data mining.

Результаты. Среди жителей Заполярья, проживающих в проблемной экологической зоне выявлены лица с доклиническими проявлениями мочекаменной болезни. Среди пациентов с мочекаменной болезнью, проживающих в Санкт-Петербурге достоверно чаще встречались такие характеристики образа жизни как злоупотребление алкоголем, нездоровая диета и негативные психосоциальные стрессы. На уровне тенденции прослеживается связь с развитием хронического бронхита.

Выводы. Патофизиологическая общность роли мукоидов в клинической картине хронического бронхита и состоянии уромукоида Тамма-Хорсфалла при мочекаменной болезни может косвенно объяснять выявленную частоту развития сочетанной патологии.

Н.В. Криворотова

**СЕЛЕКТИВНОЕ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
МЕТАБОЛИТА ЗОМАНА В РАМКАХ РЕТРОСПЕКТИВНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ИНТОКСИКАЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТАНДЕМНОЙ
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

(научный руководитель – к.б.н. Г.В. Каракашев)

НИИ гигиены профпатологии и экологии человека ФМБА России

nadezdak@yandex.ru

Современная практика реализации решений Организации по запрещению химического оружия (ОЗХО) и угроза применения отравляющих веществ (ОВ) в противоправных целях обуславливают актуальность задачи установления факта

воздействия фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) на человека. В тоже время, отсутствие в медицинской практике ретроспективных методов диагностики отравлений ФОВ делает затруднительной постановку диагноза даже через незначительный промежуток времени после воздействия, поскольку характерная симптоматика сохраняется в течение нескольких часов, редко - дней после контакта с ФОВ. Физико-химический анализ позволяет не только достоверно подтвердить факт воздействия ФОВ на человека, но и установить структуру ФОВ, послужившего причиной отравления, что не достигается при использовании биохимических методов, основанных на определении активности холинэстеразы. Ретроспективную диагностику поражений ФОВ традиционно связывают с долгоживущими биоконъюгатами ФОВ с молекулами белков. Продукты гидролитического пути метаболизма ФОВ – метилфосфоновую кислоту и ее кислые эфиры, ранее характеризовали как короткоживущие биомаркеры ФОВ, активная фаза экскреции которых продолжается несколько суток после интоксикации. В последние годы аналитическая стратегия ретроспективной диагностики поражений ФОВ может быть пересмотрена, благодаря тому, что в арсенале химико-токсикологических лабораторий появился метод тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС-МС), позволяющий проводить достоверную идентификацию метаболитов ФОВ в биопробах в сверхнизких концентрациях. Такой высокий уровень чувствительности позволяет определять алкилметилфосфонаты, медленно высвобождающиеся из состава биоаддуктов и (или) выделяемые из организма с мочой через длительные промежутки времени после воздействия низких доз ФОВ. В настоящее время на объектах по уничтожению химического оружия проводится детоксикация зомана, и мониторинг его метаболита – пинаколилметилфосфоновой кислоты (ПМФК) в биожидкостях человека является важной задачей в ряду мероприятий, направленных на охрану здоровья лиц, вовлеченных в процесс уничтожения химического оружия. Развитие современных методов хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения могло бы позволить в перспективе решать эту задачу и в клинических лабораториях.

В нашей лаборатории была разработана процедура идентификации и количественного анализа ПМФК в моче с использованием метода

высокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-селективным детектированием высокого разрешения, реализованного на приборе Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS. Предел обнаружения – 500 пг/мл может быть еще понижен при использовании концентрирования пробы. Достоверность идентификации ПМФК в исследованных образцах мочи подтверждается характеристичным распадом родительского иона в условиях тандемной масс-спектрометрии (МС/МС спектроскопия) и методом добавки в пробу заведомого стандарта.

Таким образом, разработанная процедура выгодно отличается от существующих способов простотой и экспрессностью. Получены предварительные данные, позволяющие надеяться на то, что разработанная процедура окажется пригодной для диагностики хронической интоксикации низкими дозами ФОВ.

М.А. Кучер

**ВЭЖХ-АНАЛИЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА АМИНОКИСЛОТ В
ОЦЕНКЕ НУТРИТИВНОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С
ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

(научные руководители – д.м.н., проф. Б.В. Афанасьев, д.м.н., проф. Т.Ф. Субботина)

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
кафедра гематологии, трансфузиологии и трансплантологии, отдел биохимии НИЦ

doctorkucher@yandex.ru

Аминокислотный профиль плазмы крови отличается большой индивидуальной стабильностью и формируется как результат динамического равновесия между процессами освобождения аминокислот из одних тканей (мышечная ткань, печень) и потребления их другими (мозг, печень, почки). Влияющими факторами являются рацион питания, степень усвоения питательных веществ, нарушения метаболизма индивидуальных аминокислот, как врожденного, так и приобретенного характера.

Нутритивный статус (НС) характеризуется, в первую очередь, белковой и энергетической адекватностью. Маркером белковой недостаточности является снижение концентраций незаменимых аминокислот, а также глутамина. При

белково-энергетической недостаточности отмечается особенно выраженное понижение концентраций аминокислот с разветвленной цепью (АКРЦ), метионина и аргинина, которые участвуют в анаплеротических реакциях цикла трикарбоновых кислот. Уровень ряда аминокислот достаточно специфически изменяется при функциональной недостаточности витаминов (В₆, В₁₂, В₉) и микроэлементов (железа, магния, марганца, цинка). Маркерами распада мышечной ткани являются повышенные концентрации 3-метилгистидина, пролина, оксипролина.

Нами был усовершенствован метод аминокислотного анализа плазмы для общей оценки белково-энергетического обмена и частной оценки потребности в отдельных аминокислотах у пациентов, нуждающихся в нутритивной поддержке. Пациенты с острым миелобластным лейкозом (n=11) были обследованы дважды: при поступлении в клинику и после недельного курса кондиционирования для последующей трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Анализ проводили в отделе биохимии НИЦ СПбГМУ с помощью ВЭЖХ-анализа по модифицированной методике Agilent с использованием норвалина в качестве внутреннего стандарта, что позволило повысить точность анализа. Результаты сопоставляли с данными рутинных лабораторных анализов и общепринятыми методами оценки НС.

Исходный аминокислотный профиль пациентов характеризовался достоверным и существенным снижением концентраций большинства аминокислот. В повышенных концентрациях обнаруживались глутамат и гомоцистеин как до, так и после кондиционирования. В сочетании с дефицитом АКРЦ, обнаружен недостаток глутамина, аланина, аргинина, цитруллина. Последние прямо или косвенно участвуют в транспорте аммиака и синтезе мочевины, а АКРЦ – участвуют в построении акто-миозинового комплекса и являются мощным источником сукцината в митохондриях. Положительная корреляция концентраций аргинина и глицина с содержанием общего белка (rS=0,83 и 0,70) и альбумина (rS=0,82 и 0,67) свидетельствует о том, что дефицит этих аминокислот является лимитирующим звеном в биосинтезе белка. Сопоставление отношений глицин/АКРЦ и аланин/АКРЦ ($1,09 \pm 0,32$ и $0,64 \pm 0,10$ соответственно) позволяет расценить нутритивный статус пациентов как

умеренно выраженную изокалорическую белковую недостаточность. После кондиционирования достоверных изменений нутритивного статуса по данным аминокислотного анализа не отмечено, однако появившиеся достоверные корреляции глутамина, аргинина, цитруллина, аланина и некоторых других аминокислот между собой и с уровнем мочевины указывают на активизацию катаболизма аминокислот.

Вывод. Взвешенная оценка аминокислотного статуса по отношению к показателям содержания белка и мочевины позволяет определять достижение целей при нутритивной поддержке.

А.П. Лихоносова, Н.П. Лихоносов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

(научный руководитель – д.м.н., проф. Т.Ф. Субботина)

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, отдел
биохимии НИЦ

likhonosova.a.p@mail.ru

Для диагностики, контроля лечения, профилактики осложнений сахарного диабета в практике используют определение уровня глюкозы в крови, в моче, поиск микроальбумина (МАУ) и ацетона в моче, изучение уровня гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) и фруктозамина, наличие антител к островковому аппарату и инсулину в плазме, а также уровень С-пептида, как показателя остаточной секреции инсулина β-клетками. Среди изучаемых параметров особо выделяют маркеры ранней диагностики осложнений СД: HbA_{1c} и МАУ.

Цель работы – анализ существующих аналитических методов для ранней диагностики и контроля осложнений СД.

Методы. Сравнительный анализ методов определения HbA_{1c} и МАУ: хроматография (катионнообменная высокого и низкого давления, ионообменная, аффинная, высокоэффективная жидкостная хроматография ВЭЖХ); электрофоретический метод и электрофокусирование (капиллярный электрофорез, КЭ); колориметрический метод с использованием тиобарбитуровой кислоты; нефелометрический и турбидиметрический анализ; иммунохимические методы.

Результаты. Открытый в 1901 году русским ученым М.С.Цветом метод жидкостной хроматографии получил развитие в виде ВЭЖХ. Она позволяет находить и идентифицировать вещества *на уровне следовых количеств*, а значит, имеет высокую степень разрешения и является сверхчувствительным методом. Недостатки ВЭЖХ: требует больших финансовых возможностей; не всегда применим для массовых скрининговых исследований. КЭ имеет ряд преимуществ по сравнению с ВЭЖХ: высокая эффективность разделения, за счет плоского профиля электроосмотического потока; экономичность и малый расход реактивов. Разделение одной и той же смеси анионов КЭ занимает существенно меньшее время, чем ВЭЖХ. Недостаток метода КЭ: незаряженные молекулы не могут разделяться капиллярным электрофорезом. Используемая для детекции флуоресценция применима только для веществ с естественной флуоресценцией, однако не может быть использована для определения нефлуоресцирующих образцов. Рассмотренные радиальная иммунодиффузия и радиоиммунный методы являются простыми и недорогими. К недостаткам относится длительный инкубационный периодом для первого и ограниченный срок годности (короткий периода полураспада изотопа йода) для второго. Иммунотурбидиметрия, используется для количественного определения веществ, имеет высокую стоимость. При скрининге МАУ применимы специальные тест-полоски. Но, при положительном результате, наличие МАУ необходимо в последующем подтвердить с помощью количественных или полуколичественных методов определения экскреции альбуминов с мочой. Преимуществом является готовая фабричная калибровка, количественное определение МАУ в моче, быстрое (1,5 минуты) получение результатов, что позволяет ее считать экспресс-методом, она не нуждается в любом дополнительном оборудовании, показывает высокую точность, чувствительность и специфичность и требует минимального обслуживания.

Выводы. Референсными методами для определения HbA_{1c} являются ВЭЖХ и КЭ; основной для МАУ- иммунохимический метод; выбор метода зависит от поставленной перед исследователем задачи: ВЭЖХ метод высокоточный, информативный; КЭ - быстрый и точный; иммунохимические методы – применимы для скрининговых, малобюджетных исследований.

Д.С. Лупан, В.А. Богова, О.А. Кушелева

АРГИНИН И ЛИЗИН – ПРОДУКТЫ, КАРБОКСИПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ФИБРИНОЛИЗОМ

(научный руководитель – д.м.н., проф. Т.Ф. Субботина)

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

melda@yandex.ru

Введение. Карбоксипептидазы крови являются одним из факторов регуляции фибринолиза. Разработана методика определения ассоциированной с коагуляцией/фибринолизом карбоксипептидазной активности с использованием естественного субстрата – фибрина - и определением продуктов реакции - основных аминокислот лизина и аргинина, - в среде, максимально приближенной к условиям *in vivo*.

Методы. Коагуляцию и последующий фибринолиз инициировали в плазме крови добавлением стандартных количеств тромбина и тканевого активатора плазминогена. Концентрации аргинина и лизина до, в процессе и после завершения фибринолиза определяли ВЭЖХ-анализом. Параллельно в тех же пробах определяли концентрацию аргинина более доступным методом Сакагучи. Параметры фибринолиза оценивали турбидиметрически.

Результаты. После завершения цикла коагуляции/фибринолиза отмечено достоверное и значительное увеличение концентраций аргинина и лизина, которое составило в среднем 101 и 81%, соответственно. Длительность инициации фибринолиза коррелирует со степенью прироста этих аминокислот: $r_s = -0,733$ и $-0,761$ ($p < 0,05$). Отмечается также тесная корреляция результатов, полученных с использованием ВЭЖХ-анализа и метода Сакагучи. Генерация аргинина имеет два максимума - в начале процесса лизиса сгустка и в его конце, тогда как лизин высвобождается преимущественно в середине процесса.

Выводы.

1. Высвобождение аминокислот в процессе фибринолиза является результатом активации карбоксипептидаз и может рассматриваться в качестве одного из факторов модулирования фибринолиза.

2. Генерация дополнительных количеств свободных аминокислот аргинина и лизина в месте тромбоза может способствовать быстрому и полному восстановлению кровообращения и активизации репаративных процессов.

3. Реализация разработанной технологии возможна с использованием ВЭЖХ-анализа и более доступного метода Сакагучи.

Е.Г. Маевская

АМИНОКИСЛОТЫ КАК ИСТОЧНИКИ МЕТИЛМАЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ У ЛИЦ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА

(Научный руководитель: д.м.н., проф. А.А. Жлоба)

Санкт-Петербургский Государственный Университет им. акад. И.П.Павлова

Отдел биохимии НИЦ

katya-mayewskaya@mail.ru

Введение. Митохондриальная дисфункция сопровождается органическими ацидемиями, в том числе метилмалоновой ацидемией (ММА). В литературе обычно описываются случаи, когда повышаются при ММА анаплеротические источники сукцината – аминокислоты валин, изолейцин, лейцин и метионин.

Цели. Изучение аминокислотного спектра плазмы крови и количеств образующейся метилмалоновой кислоты (ММК) у лиц старше 55 лет.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе клиник СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. Материалом ретроспективного исследования послужили 13 образцов плазмы крови пациентов, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями. Критериями для включения образцов в анализ содержание витамина **B12** в плазме крови в пределах референтных границ нормы (133 – 675 пМ). Уровень витамина **B12** и фолиевой кислоты определяли иммуноферментным методом (тест система Beckman Coulter). Митохондриальную дисфункцию определяли по уровню лактата спектрофотометрическим способом. Данные по лактату пациентов сравнивали с уровнем лактата контрольной группы доноров.

ВЭЖХ- анализом исследовали общий гомоцистеин (оГци), ММК, спектр аминокислот.

Результаты и их обсуждение. Уровень оГци в образцах пациентов был повышен и составил в среднем $16,4 \pm 1,5$ мкМ при низком содержании фолиевой кислоты, содержание которого составило $8,9 \pm 0,5$ нМ. Уровень ММК в этих образцах также был повышен и составил $3,7 \pm 0,94$ мкМ при верхней границе нормы $0,56$ мкМ. В изученном спектре 20 аминокислот отмечались также изменения - понижение содержания глицина, изолейцина, лейцина, треонина,

валина, а уровень метионина был повышен почти в 2 раза, составив $59,9 \pm 11,7$ мкМ. Уровень лактата в плазме крови составил $1,24 \pm 0,22$ мМ по сравнению с контрольной группой здоровых добровольцев ($n=12$), уровень лактата которых составил $0,244 \pm 0,07$ мМ ($p < 0,05$).

Вывод. Полученные данные указывают на то, что уровень аминокислот, являющихся источниками ММК, у лиц старшей возрастной группы не повышается, а наоборот, понижается, в отличие от лиц более молодого возраста. У лиц старшего возраста основным источником ММК является метионин.

А.А.Натыкан, М.Г.Чернобровкин

КОНТРОЛЬ ЭНАНТИОМЕРНОЙ ЧИСТОТЫ ФАРМПРЕПАРАТОВ

(научный руководитель - член-корр РАН, д.х.н. О. А.Шпигун)

Московский государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

ООО «Технология лекарств»

natykan@rambler.ru

Энантиомеры α -аминокислот имеют разную физиологическую активность, поэтому для контроля качества лекарственных препаратов, а так же для биохимических исследований важно развивать стереоселективный анализ.

Одним из способов прямого хроматографического разделения энантиомеров аминокислот является использование сорбентов с привитыми хиральными селекторами. Однако ввиду дороговизны и «хрупкости» хиральных неподвижных фаз этот подход накладывает серьёзные ограничения на состав анализируемого образца.

Новая колонка отечественного производства Nautilus-E на основе сорбента с привитым антибиотиком эремомицином демонстрирует высокую энантиселективность для α -аминокислот и ряда их производных, поэтому изучение её хроматографических свойств является перспективным.

Подобраны условия для одновременного хроматографического разделения изомеров цистина, аланина, фенилаланина, метионина, серина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, а так же глицина. Проведен анализ фармацевтических препаратов «Элтацин» и «Аспаркам». «Элтацин» содержит L-глутаминовую кислоту, L-цистин и глицин, в состав «Аспаркама» входят аспарат калия и магния. Методом ВЭЖХ проведено количественное определение действующих

веществ в препаратах и определена их оптическая чистота. Предел обнаружения спектрофотометрического детектора составил для D-изомеров аминокислот 0,1% от уровня L-изомера. Время анализа не превышает 25 минут.

Энантиомерный анализ на колонке с хиральной неподвижной фазой, затруднён, если объект содержит вещества с различными хроматографическими свойствами. Проблему можно решить, используя систему с переключением потоков. В данной работе методом двухмерной ВЭЖХ проведено определение энантиомеров аргинина в препарате «Цефепим». Предел обнаружения спектрофотометрического детектора составил для D-аргинина 0,3 % от уровня L-изомера. Время анализа не превышает 15 минут.

Е.П.Нужный

ПАРАОКСОНАЗА КАК ФАКТОР, ПРЕПЯТСТВУЮЩИЙ РАЗВИТИЮ АТЕРОСКЛЕРОЗА

(научный руководитель - д.м.н. В.В. Никитина.)

Отдел НИЦ биохимии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Параоксоназы – это семейство ферментов, способных гидролизовать токсические органофосфаты (военные яды, пестициды), эфиры ароматических карбоновых кислот, лактоны (например, тиолактон гомоцистеина, способный повреждать эндотелий), окисленные липиды в составе липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). Отдельные представители параоксоназ обладают антиоксидантными и антиатерогенными свойствами, препятствуя окислению липидов в ЛПНП путем их гидролиза, дифференцировке моноцитов в макрофаги, захвату макрофагами окисленных ЛПНП и превращению макрофагов в пенные клетки.

Название семейства связано со способностью параоксоназ гидролизовать параоксон (диэтил-п-нитрофенилфосфат). У человека известны три представителя семейства белков параоксоназ (PON) - PON1, PON2 и PON3. PON существуют в двух формах: мембраносвязанной и циркулирующей в крови. Содержание PON в сыворотке в несколько раз превышает количество фермента в органах и тканях.

Параоксоназа-1 (PON1, арилэстераза-1) - это Ca-зависимая гидролаза с широкой субстратной специфичностью. Фермент тесно связан в плазме крови с

липопротеинами высокой плотности и проявляет антиоксидантную и антиатерогенную активность, способен гидролизовать фактор активации тромбоцитов (PAF), что значительно снижает тромбообразование и хемотаксис лейкоцитов. Посредством гидрофобных N-терминалей фермент способен встраиваться в ЛПВП, тесно взаимодействуя в таком положении с апопротеином А-I (apoA-I) и, возможно, с апопротеином J (apoJ). Именно в ассоциации с ЛПВП функциональная активность PON максимальна.

Параоксоназа-2 (PON2) присутствует, по большей части, в печени. Как и PON1, этот мембранно-связанный белок предотвращает оксидацию ЛПНП. Также активность PON2 может тормозить хемотаксис моноцитов.

Параоксоназа-3 (PON3) имеет функции, схожие с PON1. Она также синтезируется в печени и секретируется в составе с ЛПВП, гидролизует окисленные фосфолипиды ЛПНП, проявляя антиатерогенную активность, однако ее активность ниже, чем у PON1.

Е. В. Объедкова

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНДО - И ЭКЗОГЕННЫХ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
(ВЭЖХ И ВЭТСХ)**

(научный руководитель - д.х.н., проф. А.А. Карцова.)

Санкт-Петербургский государственный университет

obedkovaev@gmail.com

Важной задачей в клиническом анализе является контроль за содержанием следовых количеств биологически-активных веществ. В настоящее время основными методами анализа стероидных гормонов и лекарственных препаратов являются иммунологические и хроматографические. Нами предлагается наряду с обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ) использовать метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с денситометрическим детектированием, однако пределы обнаружения аналитов достаточно высоки, что затрудняет активное использование его в практике клинической медицины. Снизить пределы обнаружения возможно грамотной стратегией *off-line* концентрирования при подготовке пробы к анализу.

Проведен подбор условий для пробоподготовки сыворотки крови и мочи к последующему хроматографическому анализу стероидных гормонов. Выявлены возможности жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракций с использованием различных элюирующих систем и сорбционных материалов (силикагель, C18 и сверхсшитый полистирол Purosep 270), а также модификаторов хроматографических систем (*циклодекстринов, ион-парных агентов*).

Одновременное определение стероидных гормонов эндо- и экзогенного происхождения (синтетические стероидные лекарства) позволяет контролировать нарушение стероидогенеза при различных эндокринных заболеваниях, а получение характеристических хроматографических стероидных профилей крайне важно в целях экспресс-диагностики.

А.С. Овечкин

**ПРОБОПОДГОТОВКА С ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИЕЙ ПРИ
ОДНОВРЕМЕННОМ АНАЛИЗЕ ОСНОВНЫХ АМИНОКИСЛОТ И
АМИНОТИОЛОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

*(научные руководители - клиническая биохимия д.м.н., проф. А.А. Жлоба,
аналитическая химия - д.х.н., проф. А.А. Карцова)*

Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет
Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, отдел
биохимии НИЦ
lackser@gmail.com

Оксид азота (NO), продуцируемый клетками эндотелия сосудов, отвечает за расслабление гладких мышц сосудов и их расширение, предотвращает агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов к эндотелию. В организме NO синтезируется клетками из аминокислоты аргинина, которая превращается в цитруллин. Этот процесс представляет собой комплексную окислительную реакцию, катализируемую ферментом NO-синтазой, которая присоединяет молекулярный кислород к конечному атому азота в гуанидиновой группе аргинина. Ингибитором реакции является асимметричный диметиларгинин (ADMA), образующийся при метилировании аргинина. Источником метильных групп служит метионин, который в ходе реакции переходит в гомоцистеин. Кроме

ADMA, в результате реакции метилирования образуются симметричный диметиларгинин (SDMA) и *N*-метиларгинин. По изменениям концентраций аминокислот, участников NO-синтазного процесса, можно судить о нарушениях в биосинтезе и метаболизме NO, которые приводят к сердечно-сосудистым заболеваниям.

В результате исследования предложена процедура одновременной твердофазной экстракции аминокислот с одной и двумя аминогруппами, являющихся участниками NO- синтазных реакций.

В.Е. Потолицына, Е.А.Бессонова

**АНАЛИЗ БЕЛКОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОЙ
ЭЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПОЛИМЕТАКРИЛАТНЫХ И ДЕНДРИМЕРНЫХ *PLOT*-КОЛОНОК**

(научный руководитель – д.х.н., проф. А.А. Карцова)

Санкт-Петербургский государственный университет

Институт Аналитического приборостроения РАН

veyaa@rambler.ru

Наряду с традиционными методами анализа биополимеров (пептиды и белки) (иммуноферментный, гель-электрофорез и ВЭЖХ) значительные перспективы открываются в использовании различных электрофоретических методов анализа – капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ). Одно из направлений развития современного электрофореза – использование для разделения сложных многокомпонентных смесей пептидов и белков метода капиллярной электрохроматографии (КЭХ).

Основные проблемы, возникающие при анализе белков: адсорбция положительно заряженных аналитов на внутренних стенках кварцевого капилляра, обусловленная электростатическими и гидрофобными взаимодействиями.

Существует несколько подходов: а) модификация поверхности кварцевого капилляра с использованием ковалентного или динамического покрытия, что влияет на электроосмотический поток (ЭОП) и, как следствие, на электрофоретическую подвижность белка; б) модификация рабочего буфера

(использование граничных значений pH, увеличение ионной силы буферного электролита и введение добавок).

Нами проведена серия экспериментов по модификации поверхности капилляра с использованием ковалентного покрытия сульфопропилметакрилатом и динамического покрытия сверхразветвленным полимером. Используются водорастворимые олигосахаридные производные сверхразветвленного полиэтиленimina. Это высокоструктурированные и сверхразветвленные трехмерные макромолекулы с молекулярной массой в диапазоне $10-10^3$ кДа, имеющие сходную с мицеллами внутреннюю и внешнюю топологию. Проверку качества покрытия проводили по зависимости величины ЭОП от pH буферного электролита.

В первом случае сильноионизированные поверхностные сульфогруппы обеспечивали стабильный ЭОП в широком диапазоне pH (2-11). Однако воспроизводимость ЭОП с использованием такого капилляра оказалась недостаточной. Во втором, – добавка дендримера в состав буферного электролита обеспечила динамическую модификацию поверхности кварцевого капилляра, что препятствовало адсорбции белков на его стенках. Это, в свою очередь, привело к увеличению воспроизводимости параметров миграции аналитов, росту эффективности и селективности разделения.

Альтернативой динамического покрытия внутренней поверхности капилляра при определении биополимеров являются капиллярные колонки с нанесенным тонким пористым слоем сорбента на внутреннюю поверхность кварцевого капилляра – PLOT-колонки и использование монолитных колонок в условиях КЭХ, которые характеризуются быстрым конвективным массообменом и высокой гидравлической проницаемостью, что обеспечивает и высокую эффективность. Разделение компонентов пробы происходит за счет сочетания механизмов электрофоретической миграции и хроматографического удерживания.

Нами синтезированы PLOT-колонки на основе сверхразветвленного полимера и полиметакрилатные монолитные колонки с положительно заряженным покрытием. полиметакрилатного монолитного сорбента и проведена оценка покрытия по величине ЭОП и Изучено влияние состава и pH буферного электролита на разделение белков в условиях КЭХ с использованием PLOT-

колонок и получены оценочные характеристики по воспроизводимости синтеза монолитных колонок с использованием лазерного микроскопа. Показана принципиальная возможность анализа белков на подготовленных монолитах методом капиллярной электрохроматографии.

О.В. Станевич

ОЦЕНКА СУТОЧНОЙ ЭКСКРЕЦИИ АМИНОКИСЛОТ С ПОТОМ

(научный руководитель – д.м.н., проф. Т.Ф. Субботина)

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

citadel91@mail.ru

Введение. Образование и выведение мочевины является основным путем экскреции продуктов метаболизма аминокислот. Однако некоторая часть аминокислот экскретируется в неизменном виде через почки и кожу. Несбалансированность рациона и режима питания, метаболические нарушения и физические нагрузки могут существенно влиять на аминокислотный состав перспирата эккринных желез кожи. Разработка технологии оценки суточной экскреции с потом аминокислот, особенно незаменимых, дает возможность выявлять метаболические нарушения и корректировать питание с целью повышения эффективности физических нагрузок у спортсменов.

Цель. Стандартизировать способ оценки суточной экскреции аминокислот с потом.

Материалы и методы. Исследуемую группу составили здоровые мужчины 19-22 лет. Сбор перспирата проводили путем кожной аппликации слоя сорбента, площадь которого составляла 9 см², после чего сорбирующий материал подвергали экстракции. Анализ экстрактов проводили спектрофотометрически путем записи спектров поглощения в диапазоне 200-600 нм. Расширенный спектр аминокислот в образцах перспирата определяли с помощью обращеннофазного ВЭЖХ-анализа с использованием хроматографа Agilent 1100.

Площадь поверхности тела рассчитывалась по формуле Дюбуа.

Результаты. Изучены различные варианты преаналитического этапа исследования перспирации в зависимости от сорбирующего материала, различного времени аппликации (30 мин. – 12 час.), области кожной поверхности и двух вариантов экстракции. Установлено, что даже короткая 30-минутная

аппликация позволяет определить в экстрактах перспирата концентрацию аминокислот, существенно превышающую предел определения ВЭЖХ-метода. Рассчитана суточная экскреция некоторых аминокислот (мет, вал, сер, арг, лиз, фен, иле) с потом по отношению к поверхности тела. Проанализированы способы расчета суточной экскреции аминокислот в зависимости от длительности аппликации и области забора пота.

Выводы. Полученные результаты суточной экскреции незаменимых аминокислот позволяют рассматривать этот метод в качестве нового, неинвазивного и информативного для оценки сбалансированности питания, метаболических нарушений и эффективности «сброса» резервов аминокислот в пул метаболитов ЦТК при анаплерозе.

М. С. Тарасова, Т. Г. Соболевский

СКРИНИНГ ГИДРОКСИЭТИЛКРАХМАЛА В МОЧЕ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(научный руководитель – зав. лаб., к.х.н. Ю.И. Дыхал)

ФГУП «Антидопинговый центр», г.Москва

newdok@yandex.ru

Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) - природный полисахарид, получаемый из амилопектинового крахмала и состоящий из остатков глюкозы. Источником получения ГЭК служит нативый крахмал (аминопектин) из клубней картофеля или зерен кукурузы восковой спелости, который подвергается расщеплению с целью получения молекул с определенной молекулярной массой, а также гидроксиэтилированию, при котором свободные гидроксильные группы остатков глюкозы замещаются гидроксиэтиловыми группами.

ГЭК – природный плазмозаменитель, который используется в терапевтических целях (способен значительно повышать онкотическое давление плазмы и стабилизировать гемодинамику). ГЭК используется некоторыми спортсменами, чтобы контролировать гематологические показатели (гемоглобин и гематокрит), а также для увеличения количества жидкости в организме, чтобы предотвратить снижение физической работоспособности из-за обезвоживания. Всемирное антидопинговое агентство (ВАДА) включило ГЭК и другие подобные плазмозаменители (декстран) в запрещенный список. В связи с этим

антидопинговые лаборатории должны иметь методы для скрининга и подтверждения использования спортсменами плазмозаменителей. Нами предложен метод колориметрического определения ГЭК в образцах мочи спортсменов, определен линейный диапазон концентраций, установлено влияние матрицы и проанализирована выборка образцов мочи спортсменов с целью установления популяционного уровня ГЭК. Типовой препарат ГЭК Гемохес 6 % HES 200/0,5 использовали для приготовления калибровочных стандартов. В качестве матрицы для приготовления калибровочных стандартов использовали фосфатный буферный раствор, а также синтетическую мочу и образцы мочи волонтеров (или их смесь). Для приготовления колориметрического реагента 2 г кристаллического йода, 3 г йодида калия растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Оптическую плотность измеряли при 490 нм на спектрофотометре ADALTIS Personal LAB (Adaltis Italia, S. p. A., Italy). 200 мкл калибровочного стандарта/образца мочи помещали в полистирольные ячейки микропланшета для ИФА анализа, добавляли 10 мкл колориметрического реагента и измеряли оптическую плотность раствора. Результаты работы показали, что линейный диапазон в значительной степени зависит от матрицы, используемой для приготовления калибровочных стандартов. Так, если в качестве матрицы использовали фосфатный буфер (pH 7.4) или синтетическую мочу, линейный диапазон наблюдался в интервале 0 – 1000 мкг/мл, тогда как использование в качестве матрицы образцов мочи волонтеров (или их смеси) позволило расширить линейный диапазон до 4000 мкг/мл. Образец, полученный от волонтера после однократной инъекции Гемохес 6 % HES 200/0,5, показал оптическую плотность значительно выше базовой. Разработанный метод очень прост в исполнении, не требует дорогостоящих реагентов и, таким образом, может использоваться как скрининг-метод в допинг - контроле для выявления отрицательных образцов. Метод не селективный и может давать кросс-реакцию с подобными ГЭК моно- и полисахарами, которые присутствуют в моче. Поэтому для подтверждения допинга плазмозаменителями, необходимо использовать более селективные хромато–масс спектрометрические методы.

Е.А. Торгалю

**ВВЕДЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ КВЕРЦЕТИНА И АКТИВНОСТЬ
АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ**

(научный руководитель – д.б.н., проф. Л.И. Остапченко)

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина, Киев

alisa210@meta.ua

Геморрагический инсульт является одним из самых распространенных и опасных цереброваскулярных заболеваний. Летальность в остром периоде составляет 40-70% в зависимости от тяжести кровоизлияния. В профилактике и лечении в послеинсультном периоде применяют фармакологические препараты, направленные на метаболическую защиту клеток мозга. С этой точки зрения, наиболее перспективными могут стать низкомолекулярные природные или синтетические препараты, которые способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и не образуют токсичных метаболитов. Такими антиоксидантными препаратами, в частности, являются кверцетин и липофлавонол. Одним из звеньев антиоксидантной системы являются ферменты антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, которые задействованы в обезвреживании таких активных форм кислорода, как супероксид-анион и перекись водорода.

Цель нашего исследования – изучение влияния кверцетина и липофлавонола на активность СОД и каталазы в тканях мозга, селезенки и почек при экспериментальном геморрагическом инсульте.

Методы и материалы. В опыте использовали белых крыс массой 180 ± 10 г, которых содержали на стандартном рационе вивария. Геморрагический инсульт у крыс вызывали путем введения во внутреннюю капсулу головного мозга аутогенной крови. Кверцетин вводили перорально, а Липофлавонол внутривенно (10 мг/кг) в течение 7 суток. Активность СОД определяли по методу [Поберезкин Н.Б. и др., 1989]. Активность каталазы в тканях крыс определяли, как показано в работе [Королюк М.А. и др., 1988]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью аналитического пакета программ "Statistica" с использованием критерия Стьюдента (t).

Результаты и их обсуждения. Анализ экспериментальных данных указывает на то, что во всех исследуемых органах при экспериментальном инсульте активность СОД и каталазы по сравнению с контрольными значениями достоверно снижается. Так, при экспериментальном инсульте на фоне введения препарата кверцетина активность СОД повышалась в почках почти в 2 раза и в селезенке - в 1,5 раза, соответственно. Активность каталазы при введении кверцетина повышалась в мозге, в селезенке активность снижалась и в почках достоверно не отличалась от контрольных величин. При действии липофлавона установлено, что по сравнению с контролем активность СОД возрастала в мозге, почках и селезенке. Активность каталазы при введении липофлавона существенно возрастала в головном мозге, в почках - снижалась, а в селезенке не отличалась от контрольных величин.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что геморрагический инсульт сопровождается снижением в исследуемых органах крыс, особенно в тканях головного мозга, активностей таких антиоксидантных ферментов, как СОД и каталаза.

Выводы. Введение препаратов с антиоксидантами свойствами (в частности кверцетина и липофлавона) приводит к нормализации процессов липопероксидации и функционирования антиоксидантной системы, что подтверждается повышением активности СОД и каталазы.

И.Э.Ушал, М.А.Власенко

**ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО
СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ СКЛОННОСТИ К
ОСТЕОПОРОТИЧЕСКОМУ ПОРАЖЕНИЮ КОСТЕЙ У ЖЕНЩИН
МОЛОДОГО ВОЗРАСТА**

(научный руководитель - д.м.н., проф. И.И. Шантырь)

ФГУЗ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС
России», Санкт-Петербург

innaushal@mail.ru

Наиболее часто встречающиеся формы остеопороза – постменопаузальный и сенильный. Тем не менее, достаточно часто снижение минеральной плотности кости (МПК) наблюдается у женщин молодого возраста. В настоящее время для оценки минеральной плотности кости в клинической практике наиболее широко применяется метод двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии. Однако традиционно данное исследование назначают женщинам старшего возраста. Традиционно в дифференциальной диагностике заболеваний скелета метаболического характера важную роль играет оценка гормонального статуса больных, в частности, исследование паратиреоидного гормона, половых стероидных и гонадотропных гормонов, а также витамина D, участвующего в регуляции обмена кальция. Определение концентрации кальция, фосфора и общей активности щелочной фосфатазы сыворотки крови используется в оценке общего статуса больного и имеет вспомогательное, но не диагностическое значение. Проведение данных анализов, как правило, рекомендуется уже при выявлении снижения МПК. В связи с этим актуально проведение скрининговых исследований для раннего выявления остеопороза неинвазивными методами не сопряженными с дозовой нагрузкой. В качестве такого исследования может выступать биоэлементный анализ проб волос методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС). Он позволяет одновременно определять в одной пробе содержание макро-, микро- и ультрамикроэлементов, что очень важно при оценке взаимодействия и взаимовлияния одних элементов с другими в организме человека. Несомненными достоинствами метода ИСП-МС являются высокая чувствительность и избирательность метода, надежность современного оборудования, простота и точность калибровки по общедоступным

стандартизированным образцам, относительная свобода от взаимных физических и химических влияний при анализе.

Методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе X-SERIES II определяли содержание 30 биэлементов в пробах волос женщин. Выбор биосубстрата обусловлен тем, что анализ проб волос позволяет интегрально оценить биоэлементный статус организма, кроме того является неинвазивным методом.

В ходе исследования, у ряда пациенток выявлены следующие особенности биоэлементного статуса: превышение кальция, магния, марганца, бария в пробах волос, не обусловленное приёмом минеральных добавок. Пациенткам с таким биоэлементным профилем рекомендовали исследование МПК. В подавляющем большинстве случаев наблюдалось снижение данного показателя, в ряде случаев речь шла уже о выраженном остеопеническом синдроме - остеопорозе (потеря костной массы до 20 %).

Полученные данные позволяют рекомендовать биоэлементный анализ волос методом ИСП-МС женщинам после 30 лет для раннего выявления склонности к остеопорозу.