

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



Всероссийская IV-я научная конференция

АНАЛИТИКА КАК ИНСТРУМЕНТ КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

25-26 апреля 2012

Санкт-Петербург
2012



Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
**«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМ. АКАД. И.П. ПАВЛОВА»**
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Отдел биохимии Научно-исследовательского центра

Всероссийская IV-я научная конференция
**«Аналитика как инструмент
клинической химии»**

Санкт-Петербург, 25-26 апреля 2012 года

Бюллетень

Санкт-Петербург

2012

УДК 543/545 (063)
ББК 24.4
А 64

- А 64 **Всероссийская IV-я научная конференция «Аналитика как инструмент клинической химии»** (Санкт-Петербург, 25-26 апреля 2012 г.): бюллетень конференции / Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, 2012. – 84 с.

Бюллетень Всероссийской IV-ой научной конференции «Аналитика как инструмент клинической химии» включает результаты научных исследований специалистов в области клинической биохимии, в том числе работы студентов по актуальным проблемам лабораторной медицины. Значительную часть тезисов докладов и полнотекстовых статей составляют исследования с использованием методов разделения (ВЭЖХ-анализ).

Адресовано специалистам в области клинико-биохимических исследований.

В 2013 году ежегодная конференция в рамках секции «Клиническая биохимия» традиционно состоится в конце апреля.

In the 2013 annual conference of the section "Clinical Chemistry" will be at the end of April.

Тексты приведены в редакции авторов без правок оргкомитета конференции

© Санкт-Петербургский
государственный
медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, 2012

Раздел I
Тезисы лекций специалистов в области клинической
биохимии

проф. А.А. Жлоба
**КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИСФУНКЦИИ
МИТОХОНДРИЙ
(тезисы лекции)**

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург, Россия
ФГБУ «ФЦ сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия
zhloba@mail.spbnit.ru, 8-(812)-499-71-08

Митохондриальная дисфункция лежит в основе ряда известных патологических состояний, включая ишемические состояния тканей, врожденные и приобретенные миопатии, невропатии, гипотиреозидизм, а также сердечную недостаточность. В исследованиях, проведенных в Отделе биохимии за последние пять лет, изучены маркеры митохондриальной дисфункции в старшей возрастной группе (>55 лет).

Методами ВЭЖХ- анализа в тандеме с различными способами детектирования, ИФА-анализом и другими, оценивали варьирование интермедиатов цикла Кребса и метилмалоновой кислоты, спектра аминокислот, минорных метаболитов аргинина, других аминокислот, общего гомоцистеина (oГци) и витаминов В₉ и В₁₂. Показано, что для характеристики митохондриальной дисфункции в старшей возрастной группе помимо традиционных молочной, привиноградной кислот, иона аммония и аланина в список аналитов следует включить: метилмалоновую кислоту, валин, лейцин, изолейцин, аргинин, цитруллин, орнитин, метионин, цистеин, глицин, тирозин, фенилаланин. При определении аминокислот митохондриальная дисфункция может проявляться повышением уровня аланина и увеличением соотношения аланин/лизин до значений выше 2,5. Возрастание данного соотношения соответствует повышению пирувата в крови. В случае накопления в крови метилмалоновой кислоты и разветвленных аминокислот – валина и изолейцина характеристика митохондриальной дисфункции дополняется отсутствием эффективности анаплеротических реакций, протекающих с участием В₁₂-зависимой метилмалонил-СоА- мутазы (диссертационное

исследование, выполненное Е.Г. Маевской, выполненное с 2008 по 2011 г на тему: «Системные метаболические признаки митохондриальной дисфункции у лиц с гипергомоцистеинемией»). Эта анаплеротическая дисфункция может зависеть, как от недостатка апофермента, так и коферментной формы витамина в виде аденозилкобаламина в митохондриях. Другое производное витамина В₁₂ в виде метилкобаламина в цитоплазматической реакции участвует в реметилировании гомоцистеина. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень оГци у лиц старшей возрастной группы может в значительной мере зависеть от дефицита коферментной формы витамина В₁₂, а не только - В₉. Для оценки параметров связи митохондриальной и эндотелиальной дисфункции имеет значение определение минорных продуктов метилированного аргинина, аминотиола гомоцистеина и его распределения между фракциями белков плазмы крови.

Наблюдаемые у лиц старшей возрастной группы сдвиги в уровнях метаболитов плазмы крови в существенной мере зависят от состояния митохондрий. В метаболизме мышечной, нервной ткани, почек, печени и других тканей большое значение имеет бета- окисление жирных кислот (ЖК) с последующим окислением ацетата в цикле трикарбоновых кислот. Одним из существенных направлений изменения энергетики организма при переходе от детского к взрослому периоду является замена преимущественно углеводной зависимости клеток к зависимости от использования насыщенных ЖК и кетонных тел. Кроме того, у взрослых объем потребляемой глюкозы сдерживается в клетках, поглощаемой из кровотока молочной кислотой. Переключение энергетического метаболизма от утилизации ЖК на преимущественно глюкозную энергетику, например в результате ишемии ткани, часто обозначают, как переключение на раннюю, зачаточную и даже плодную энергетку. Вклад глюкозы и лактата в энергетический метаболизм у взрослого человека

составляет, примерно треть, остальные две трети зависят почти целиком от бета-окисления ЖК. В нормальном миокарде более 60% энергетики зависит от окисления ЖК. Глюкоза является важнейшим энергетическим источником в ишемизированной ткани. Известно, что глюкоза позволяет сохранить генерацию АТФ при угнетении дыхательной функции митохондрий за счет субстратного фосфорилирования. Кардиомиоциты более чувствительны к ишемии, чем другие клетки, поскольку эти клетки не в состоянии быстро индуцировать синтез ферментов других путей. При этом гликолиз может не активироваться, а замедляться. Это происходит не только из-за истощения запасов гликогена, но и вследствие внутриклеточного ацидоза, который тормозит фосфорилирование в фосфофруктокиназной реакции. Метаболический ацидоз, в свою очередь, зависит от накопления лактата при торможении утилизации пирувата и неполного окисления других промежуточных карбоновых кислот в митохондриях. В клетках богатых митохондриями последствия ишемии сопровождаются более выраженным ацидозом, чем в клетках с низкой плотностью митохондрий. Эти изменения являются одной из причин нарушения физиологических процессов возбуждения и проведения. Нарушение поддержания ионных градиентов между цистернами и цитозолем, между межклеточной средой и цитозолем может вести к гибели клетки. Если уровень АТФ снижается слишком сильно, возникает некроз. Снижение запаса АТФ менее, чем на 70%, может вести не к некрозу, а к апоптозу. Наиболее важными последствиями этой дисфункции являются стресс эндоплазматического ретикулума и также окислительный стресс. Митохондрии при ацидозе теряют существенные количества растворимого цитохрома – цитохрома *C*. Потеря цитохрома *C* митохондриальной мембраной является важнейшей причиной активации каспаз 8, 9, 12 и 3. Помимо каспазных, возможны и другие пути перехода к апоптозу посредством участия митохондрий. Они связаны с нарушением

поддержания митохондриальных трансмембранных градиентов, например, с участием фактора *BNIP3*. Это ведет к быстрому образованию пор, через которые теряются различные митохондриальные белки, в особенности, цитохром *C*. Регистрация уровня цитохрома *C* и лактата в крови позволяет обнаруживать связь между ацидемией, переходящей в ацидоз, с одной стороны, с нарушением проницаемости митохондриальных мембран, с другой.

Помимо источников пирувата, существенный вклад в митохондриальную энергетику в патологических условиях могут вносить источники интермедиатов цикла Кребса. К ним относятся метаболиты предшественники пропионил-*CoA*. Для диагностики возрастной митохондриальной дисфункции следует проводить определение уровня анаэробных источников сукцината в крови, включая пропионил-карнитин, метилмалоновую кислоту и спектр аминокислот. Это позволяет дополнительно охарактеризовать состояние резервных путей пополнения интермедиатов цикла Кребса в условиях снижения эффективности основных путей энергетического метаболизма. Митохондриальная и эндотелиальная дисфункции являются устойчивыми нарушениями метаболизма, влияющими на развитие частного патологического процесса, в тканях с большим объемом кровотока и количеством митохондрий. Рутинные анализы практически используют не более 1% метаболома для диагностических целей. Лабораторная диагностика в данной области сдерживается необходимостью одновременного анализа около 50 метаболитов (метаболическое профилирование) из различных органических классов, диапазоном их концентраций от наномолярных до миллимолярных и отсутствием единых представлений о пробоподготовке, неопределённостью референтных интервалов.

проф. Т.Ф. Субботина
**ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ НУТРИТИВНОГО СТАТУСА В
УСЛОВИЯХ СНИЖЕНИЯ ФОЛИЕВО-ЗАВИСИМОГО МЕТАБОЛИЗМА
(тезисы лекции)**

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург, Россия

ФГБУ «ФЦ сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия
subbotina2002@mail.ru, 8-(812)-499-71-08

Согласно большинству авторитетных исследователей, понятие «Нутритивный статус» (НС) определяется как «состояние организма в связи потреблением и утилизацией нутриентов» (state of the body in relation to the consumption and utilization of nutrients). Исследование НС человека включает оценку адекватности поступления в организм источников энергии, пластического материала, а также незаменимых компонентов. Оценка НС является актуальной задачей при самом широком круге патологий взрослых и детей, в спорте высших достижений, а также для лиц, занимающихся физическим самосовершенствованием. Актуальность особенно возросла в связи с появлением на рынке специализированных препаратов для нутритивной парентеральной и энтеральной поддержки, включающих такие компоненты, передозировка которых нежелательна и даже опасна.

Однако наиболее частым случаем является диагностика дефицитов питания. Они могут возникать как вследствие нехватки одного нутриента, так и вследствие общей пищевой недостаточности. Достаточно часто также бывает, что тяжесть состояния пациента определяется сочетанием общей белково-энергетической недостаточности со специфическими дефицитами по одному или даже нескольким незаменимым компонентам. Например, при онкопатологиях прогрессирующее общее снижение питания, как правило, сопровождается проявлениями дефицита по определенным витаминам вследствие повышенной потребности в них со стороны растущей опухолевой ткани, антивитаминой активности

химиопрепаратов, либо вследствие мальабсорбции. Столь же сложны и разнообразны могут быть причины дефицита в организме микроэлементов.

Диагностика НС при сочетанных дефицитах сложна и требует комплексного подхода. Лабораторные методы клинической биохимии имеют своей целью не только точно выявить дефицитный нутриент, но и оценить степень вызванных этим дефицитом метаболических нарушений, в том числе с точки зрения формирования общепатологических синдромов – митохондриальной и эндотелиальной дисфункций.

У пациентов с онкогематологическими заболеваниями весьма часто белково-энергетическая недостаточность сочетается с анемией, в патогенезе которой может лежать дефицит нескольких факторов – витаминов В12, фолиевой кислоты (ФК), В6, железа, транспортных белков. Оценка НС в данном случае, в дополнение к общепринятым методам субъективной общей оценки и антропометрическим методам, должна включать определенную лабораторную панель, содержащую как методы, позволяющие уточнить степень выраженности белково-энергетической недостаточности (экскреция мочевины и креатинина, определение концентрации в плазме крови быстро обновляемых белков – альбумина, трансферрина, преальбумина, ретинол-связывающего белка, анализ спектра аминокислот плазмы), так и методы, позволяющие уточнить характер и выраженность витаминной недостаточности. Концентрация ФК в плазме, определенная ИФА-анализом, сильно зависит от количества, недавно поступившего с пищей; для оценки резерва ФК более правильно определять концентрацию в эритроцитах. Важно диагностировать одновременно сопутствующий дефицит по витамину В12, поскольку если он имеется, то терапия только фолатами усиливает неврологические проявления В12 дефицита. Кроме того, необходимо оценить адекватность поступления витамина В6, метаболически связанного с обоими витаминами.

Прямое определение концентрации витаминов в биологических жидкостях возможно методами ИФА-анализа, однако при этом диагностика гиповитаминозов сталкивается с рядом трудностей. Так, концентрация витамина В12 в плазме не всегда отражает его внутриклеточную концентрацию, его производные нестабильны, а сама концентрация лежит в пиколярной области. Витамины В6 и ФК имеют несколько молекулярных форм, и нет единого мнения, которые из них информативнее для оценки НС. Кроме того, успешность выполнения витамином своей функции зависит не только от обеспеченности им самим, но и от достаточности синтеза белковой части – апофермента. Это особенно важно, поскольку биосинтез апоферментов легко может нарушаться при общей белково-энергетической недостаточности. В этих условиях прямое определение витаминов в биологических жидкостях мало информативно, но гораздо важнее диагностика метаболических сдвигов, вызванных дефицитом этих витаминов.

Следует отметить, что метаболизм витаминов В12, В6 и ФК тесно взаимосвязан. Так, дефицит по каждому из этих трех витаминов сопровождается возрастанием концентрации гомоцистеина. Известно, что гипергомоцистеинемия является независимым фактором риска артериальной гипертензии, атеросклероза, тяжелых неврологических расстройств. Однако в данном случае определение концентрации гомоцистеина не поможет уточнить характер и степень гиповитаминоза. В качестве более специфичных метаболических маркеров предложены некоторые органические кислоты: метилмалоновая и формиминоглутамат в качестве маркеров функциональных дефицитов витаминов В12 и ФК, соответственно, ксантуреновая и кинуреновая кислоты в качестве маркеров дефицита по витамину В6. Эти метаболиты являются субстратами специфических витамин-зависимых метаболических реакций. Следует отметить, что анализ биологических жидкостей на содержание

органических кислот малодоступен в практической медицине, поскольку оптимальным методом анализа является жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, которая позволяет определить концентрации всех кислот в рамках одного анализа.

Более доступным вариантом метаболомного анализа в оценке НС может быть определение спектра аминокислот плазмы крови ВЭЖХ-анализом с предколоночной ОРА-derivатизацией и флюориметрическим детектированием. В Отделе биохимии НИЦ СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова разработана лабораторная диагностическая технология определения расширенного спектра аминокислот, которая позволяет с большой точностью определить концентрацию 21 аминокислоты в любой биологической жидкости в рамках одного анализа. 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). Исследование концентраций аминокислот плазмы в сочетании уровнями альбумина плазмы и экскреции мочевины позволяет как судить о выраженности белково-энергетической недостаточности, так и увидеть специфические метаболические проявления отдельных дефицитов. Так, маркером белковой недостаточности является снижение концентраций незаменимых аминокислот, а также глутамина. При белково-энергетической недостаточности отмечается особенно выраженное понижение концентраций аминокислот с разветвленной цепью, а также аргинина. Дефицит витамина В12, наряду с повышением уровня гомоцистеина и снижением концентрации метионина, проявляется повышением концентраций аминокислот-предшественников метилмалонил-КоА – валина и изолейцина, а дефицит по ФК –

повышением концентрации аминокислоты-предшественника формимино-глутамата – гистидина.

Значимость исследования аминокислотного профиля в оценке НС была с успехом апробирована в группе пациентов с острым миелобластным лейкозом и трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Нам представляется, что накопленные к настоящему времени эмпирические данные и степень изученности метаболических путей таковы, что наиболее перспективным является именно такой подход – создание расширенной, но в то же время продуманной и обоснованной панели метаболомных маркеров, осуществимой в пределах одного анализа. Это позволит выявить наиболее значимые дефициты нутриентов и оценить выраженность метаболических последствий с точки зрения развития вторичной митохондриальной дисфункции, эндотелиальной дисфункции, гипометилирования – общепатологических процессов, которые на молекулярном уровне лежат в основе многих заболеваний.

проф. А.А. Карцова
**ХРОМАТОГРАФИЯ И КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ЦЕЛЯХ
МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**
(тезисы лекции)

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

Введение. Хроматографический и электрофоретический контроль содержания в биологических жидкостях нейротрансмиттерных гидроксид- и аминокислот, катехоламинов и их метаболитов, стероидных гормонов и сахаров является важной аналитической задачей для клинической диагностики различных заболеваний.

Цель. Выявление новых возможностей определения биологически активных соединений (белков, нейротрансмиттеров, стероидных гормонов, сахаров, аминокислот и т.д.) в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча) хроматографическими (ОФ ВЭЖХ, ВЭТСХ) и электрофоретическими (КЗЭ, МЭЖХ, КЭХ) с использованием процессов комплексообразования (включая лигандный обмен) и on-line концентрирования.

Материалы и методы. В работе использованы хроматографические (ОФ ВЭЖХ с УФ- и ВЭТСХ- с денситометрическим детектированием) и электрофоретические (капиллярный зонный электрофорез, мицеллярная и микроэмульсионная электрокинетическая хроматография, капиллярная электрохроматография) методы анализа. Пробоподготовка биологических образцов (сыворотка крови, моча) проводилась с использованием твердофазной экстракции на сорбентах С18 и сверхсшитом полистироле.

Результаты и обсуждение. Основными проблемами электрофоретического и хроматографического определения многих биологически активных соединений в биологических объектах являются отсутствие в их молекулах хромофорных групп (*сахара, алифатические аминокислоты и амины*), низкие значения констант диссоциации (*сахара*), недостаточная стабильность в процессе анализа (*катехоламины,*

антиоксиданты полифенольного типа), низкие концентрации. Использование процессов комплексообразования и различных способов концентрирования позволяет расширить аналитические возможности методов разделения. В качестве комплексообразующих агентов выбраны циклодекстрины, макроциклические антибиотики, краун-соединения, ион-парные агенты, катионы металлов в составе матрицы пробы, подвижной фазы и в качестве модификаторов кварцевого капилляра или сорбента (метод ВЭТСХ), что обеспечило увеличение эффективности, селективности разделения и снижение пределов обнаружения чувствительность определения аналитов. В работе изучены подходы к выбору систем лигандного обмена и аналитические возможности метода лигандообменного капиллярного электрофореза (ЛОКЭ) при определении аминокислот, аминов, сахаров, полифенолов. Показано, что метод ЛОКЭ позволяет обнаруживать соединения, не поглощающие в УФ-области. Использование процессов лигандного обмена оказалось полезным и при электрофоретическом определении поглощающих аминокислот и аминов: пределы обнаружения триптофана, тирозина, гистамина в ЛОКЭ были снижены в 2 – 3 раза по сравнению с капиллярным зонным электрофорезом и составили 1 – 3 мг/л. Интересным результатом использования режима лигандообменного капиллярного электрофореза явилась возможность одновременного определения сахаров (*прямое детектирование* в виде комплексов *сахар–Cu²⁺*) и неорганических катионов Na⁺, K⁺ (*косвенное детектирование*). Выявлены возможности хирального разделения аминокислот и нестероидных лекарственных препаратов в условиях ВЭТСХ и КЭ и способов *on-line* концентрирования (стэкинг и свипинг) при определении стероидов, биогенных аминов, сахаров.

Выводы. Установлены закономерности электрофоретического и хроматографического разделения стероидов, катехоламинов, сахаров с

использованием процессов комплексообразования. Предложены способы on-line концентрирования (ПО 5-50 мкг/л).

Л.А. Александрова
**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКСИДАТИВНОГО
СТРЕССА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**
(тезисы лекции)

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург, Россия
ФГБУ «ФЦ сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия
laa2004@mail.ru, 8-(812)-499-71-08

Оксидативный стресс проявляется в накоплении поврежденных оснований ДНК, продуктов окисления белков и пероксидации липидов, а также в снижении уровня антиоксидантов и связанной с этим повышенной восприимчивостью липидов мембран и липопротеинов к действию прооксидантов, включая ионы Fe^{2+} или H_2O_2 .

Окислительное повреждение эндотелия сосудов лежит в основе как артериальных, так и венозных сосудистых патологий. Чрезмерная продукция активных форм кислорода (АФК), в первую очередь, супероксидных анионов в сосудистой стенке вносит вклад в эндотелиальную дисфункцию при заболевании сосудов. Основной эндогенный источник АФК - это митохондрии эндотелиальной клетки, в которых нарушается перенос электронов по цепи дыхательных ферментов. В митохондриях клеток нормально функционирующего организма, по разным данным, от 0,2% до 5% молекулярного кислорода в процессе переноса электронов превращается в супероксид, который инициирует процессы свободно-радикального окисления (СРО). Кроме того, генерирующая супероксид NADPH-оксидаза эндотелиоцитов идентифицирована как важный эндогенный источник свободных радикалов в сосудистых тканях. Экзогенным источником АФК в русле крови служат полиморфноядерные лейкоциты.

Внутренняя мембрана митохондрий защищена большим количеством ловушек свободных радикалов, включая восстановленный глутатион, витамин С, α -токоферол, а также ключевой антиоксидантный фермент митохондриальную супероксиддисмутазу (СОД). Неспособность в полной

мере нейтрализовать избыток АФК и недостаточность антиоксидантной системы (АОС) в эндотелиоцитах ведет к развитию окислительного стресса (ОС). Развитие патологического процесса сопровождается деструктивными морфологическими изменениями ультраструктуры митохондрий эндотелиоцитов, нарушением процесса клеточного дыхания и устойчивой лактоацидемии. Подобное состояние характеризуется термином «митохондриальная дисфункция» (МД). Классические митохондриальные патологии представляют собой гетерогенную группу наследственных заболеваний, вызванных генетически детерминированным нарушением тканевого дыхания с разобщением процессов окислительного фосфорилирования и электрон-переносающей цепи. Представление о наследственной митохондриальной дисфункции базируется на утверждении, что увеличенная генерация АФК митохондриями ответственна за состояние эндотелиальной функции, потерю способности релаксации и развитие воспаления в стенке сосуда, ведущего к возникновению сосудистых заболеваний. Имеются указания на то, что развитие патологии артерий и в меньшей степени болезней вен в определенной степени связано с возрастной МД. Эндотелиальная клеточная дисфункция часто сочетается с нарушениями гемостаза вследствие активации процессов СРО. Исследование СРО при сочетании эндотелиальной и возрастной митохондриальной дисфункции ненаследственного генеза может представлять интерес для разработки методов ранней диагностики и новых подходов к коррекции патологии венозных сосудов.

Цель работы состояла в исследовании показателей состояния СРО и АОС в плазме крови больных с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза на фоне лактоацидемии (АВСФ).

В работе использовали плазму крови, стабилизированную цитратом натрия, от 38 больных с тромбозами с уровнем D -димеров > 500 мкг/л. В

качестве контроля использовали показатели крови 30 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами основной группы.

Интенсификация СРО выражалась в увеличении уровня ТБКРП в 1,3 раза, снижении содержания SH-групп в 1,5 раза. Активность СОД при этом была снижена в 1,4 раза по сравнению с группой доноров. Повышение концентрации D-димера коррелировало со снижением суммарной активности СОД в плазме крови.

При разделении данных на группы с лактоацидезией ($3,2 \pm 0,28$, $n=30$) и нормолактатемией ($1,0 \pm 0,20$, $n=7$) выявлены различия по степени ОС. В группе пациентов с лактоацидезией ОС характеризовался увеличением уровня ТБКРП ($p < 0,05$) на 40% при сравнении с донорами и почти на 30% при сравнении с группой пациентов с нормолактатемией, в которой достоверных изменений этого показателя не обнаружено. Угнетение АОС у пациентов с лактоацидезией, было выражено примерно в одинаковой степени по сравнению с группой нормолактатемии, при этом концентрация SH-групп составляла 68%, а активность СОД - 74% от контроля.

Повышение концентрации D-димера, характерное для эндотелиальной дисфункции, коррелировало со снижением СОД в плазме крови. АВСФ сопровождалась лактоацидезией, по-видимому, вследствие митохондриальной дисфункции, вызванной окислительным стрессом.

Таким образом, нарушение процессов СРО, как внутри митохондрий, так и внешнего окружения ведет к нарушению энергетики клетки, устойчивой лактоацидезии и может вносить вклад в развитие МД. Выявленные взаимосвязи энергетических и окислительных процессов при нарушениях внутрисосудистого свертывания и фибринолиза показывают необходимость более углубленного изучения биохимических механизмов развития возрастной митохондриальной дисфункции.

Н.А. Филиппова
**ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ И ПРОДУКТЫ NO-СИНТАЗНОЙ
АКТИВНОСТИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ АУТОИММУННОЙ
ПАТОЛОГИЕЙ**
(тезисы лекции)

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
кафедра госпитальной терапии, Санкт-Петербург, Россия
nafil@mail.ru

Основным аспектом патогенеза аутоиммунных заболеваний является выработка антител против широкого спектра клеточных структур и рецепторов. Это приводит, в том числе, к активации эндотелиоцитов, играющей важную роль в дальнейшем развитии патологического процесса.

Один из наиболее значимых аспектов эндотелиальной дисфункции связан с активацией индуцибельной NO-синтазы под воздействием провоспалительных цитокинов (прежде всего, ФНО-альфа). Продукты NO-синтазной активности не только влияют на гемостатическую (тромборезистентность сосудистой стенки) и вазомоторную функции эндотелия, но и активно участвуют в других патологических процессах, развивающихся при аутоиммунной патологии. Активация перекисного окисления липидов, обусловленная повышением продукции нитратов и нитритов, способствует дальнейшему нарушению функций эндотелия, развитию вторичного васкулита и активизации других патологических процессов, в частности, воспалительного остеопороза. У больных ревматоидным артритом обсуждается возможность влияния оксида азота и его метаболитов на деструкцию суставного хряща. Показана их роль и в развитии специфического поражения внутренних органов.

Повышение уровня продуктов NO-синтазной активности (нитраты, нитриты, нитрозотиолы) в сыворотке крови выявляется у больных с широким спектром ревматологической патологии (ревматоидный артрит, серонегативные артриты, узелковый периартериит, криоглобулинемический васкулит, АНЦА-зависимые васкулиты). Выраженность повышения коррелирует с клинико-лабораторными

маркёрами активности. В экспериментальных моделях (болезнь Kawasaki) показана связь между локальным повышением активности iNOS, пероксинитрита и нитротирозина в отдельных участках коронарных артерий экспериментальных животных и развитием характерных для этого заболевания аневризм.

При этом активация индуцибельной синтазы осуществляется в сравнительно короткие сроки (несколько часов), что делает возможным использование продуктов NO-синтазной активности для ранней оценки эффективности лечения ревматологических больных. Исследований, посвящённых данному вопросу, сравнительно немного, однако некоторыми авторами показано снижение сывороточного уровня нитратов, нитритов и NOx до через 120 минут после инфузии инфликсимаба. Таким образом, ранняя оценка содержания нитратов и нитритов на фоне лечения может помочь в решении одной из наиболее острых проблем ревматологии – индивидуального подбора биологических препаратов.

В то же время, существует ряд заболеваний, при котором имеет место значительное снижение уровня нитратов и нитритов крови, даже по сравнению со здоровыми лицами.

Как правило, это ассоциируется с повышенным риском тромботических осложнений (болезнь Бехчета, первичный антифосфолипидный синдром). В перечисленных случаях имеет место преимущественное снижение экспрессии синтазы эндотелиального типа и, как следствие, снижение тромборезистентности сосудистой стенки.

Не менее значима и роль продуктов NO-синтазной активности в развитии специфического поражения внутренних органов на фоне ревматологической патологии.

Активный гломерулонефрит (показано у больных с гранулематозом Вегенера) сопровождается дисбалансом экспрессии основных типов синтаз. Имеет место значительная активация iNOS с формированием

нитротирозина, экспрессия же эндотелиальной синтазы в капиллярах клубочков снижается.

У больных интерстициальной болезнью лёгких, возникающей на фоне аутоиммунной патологии (системная красная волчанка, системная склеродермия), как правило имеет место значительное повышение экспрессии индуцибельной синтазы, внутриальвеолярного NO и содержания NO в выдыхаемом воздухе. Уровень внутриальвеолярного оксида азота достоверно коррелирует с КТ-признаками воспалительного процесса (наличие «матового стекла», интерстициальные изменения) и нарушением диффузионной способности лёгких.

В биоптатах, полученных из зон «матового стекла», выявлена повышенная экспрессия синтазы индуцибельного типа.

В то же время, при исследовании образцов, взятых из зон с преобладанием фиброзных изменений (по типу «сотового лёгкого») имеется значительное снижение экспрессии обоих типов синтаз, что свидетельствует о подавлении NO-синтазной активности на фоне ремоделирования и фиброза. В качестве ключевого цитокина, осуществляющего сопряжение воспалительного процесса, активности NO-синтаз и развития фиброза рассматривается TGF-бета, который, с одной стороны, up-регулируется оксидом азота, а с другой – подавляет активность iNOS.

Снижение содержания внутриальвеолярного NO отмечается и при другом варианте поражения лёгких – диффузном альвеолярном кровотечении, обусловленном развитием иммунокомплексного капиллярита. Причина этого – не в снижении активности синтаз, а в связывании внутриальвеолярного оксида азота гемоглобином.

Значимая роль NO-синтаз в патогенезе аутоиммунных состояний обуславливает и влияние индивидуальных полиморфизмов этих ферментов на предрасположенность к ревматологическим заболеваниям. Достоверная

связь с некоторыми полиморфизмами iNOS выявляется при ревматоидном артрите, гигантоклеточном височном артериите Хортона, болезни Такаясу, болезни Бехчета, системной красной волчанке. Таким образом, эти полиморфизмы могут рассматриваться как прогностические маркеры, свидетельствующие о возможности развития аутоиммунной патологии и о более тяжёлом её течении.

Таким образом, у больных с системной аутоиммунной патологией перспективным представляется исследование содержания продуктов NO-синтазной активности в различных биологических средах, в том числе сыворотке крови, бронхиальном лаваже и выдыхаемом воздухе.

ГТ ГАЛА - ТРЕЙД
WWW.GALATRADE.RU



Химические реактивы
Стандартные образцы
Все для хроматографии
Аналитические приборы
Лабораторное оборудование

193231, г. Санкт-Петербург,
 ул. Латышских Стрелков д. 31 оф. 501А
 Тел./Факс: (812) 448-91-09
 E-mail: info@galatrade.ru



www.galatrade.ru

REDA

WALLEN

ALCANTARA

Fluka

SARCO



Раздел II

Научные работы молодых ученых и студентов

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

Е.С. Алексеевская
**ПРИМЕНЕНИЕ МНОГОУРОВНЕГО АНАЛИЗА ДАННЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ
КАНДИДАТНЫХ ОБЪЕКТОВ МЕТАБОЛОМА ПЛАЗМЫ КРОВИ**

(научный руководитель - д.м.н., проф. А.А. Жлоба)

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург, Россия

alizlex@mail.ru

Введение. Коррекции нарушений энергетического обмена в современной медицине уделяется недостаточная роль, несмотря на то, что дисбаланс энергетики может предшествовать нарушению функции эндотелия.

Цель. Оценить связь митохондриальной и эндотелиальной дисфункции у пациентов с активацией внутрисосудистого свертывания.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 38 пациентов (12 мужчин и 26 женщин) в возрасте от 40 до 60 лет (средний возраст $52,8 \pm 2,2$) с содержанием D-димера в крови выше 250 нг/мл. D-димер в плазме крови определялся иммунотурбидиметрическим методом по набору «Smart Д-димер тест» (Eurolyser Diagnostica GmbH, AUSTRIA). Определение общего гомоцистеина (oГци) и спектра аминокислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Лактат в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом в нашей модификации. Референтную группу составили 20 условно здоровых доноров в возрасте от 30 до 40 лет со значениями D-димера в пределах референтного интервала. Содержание аминокислот оценивали относительно известных в литературе референтных значений. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы SPSS 16.0.

Результаты и обсуждение. У всех обследованных пациентов концентрация лактата значительно превышала значения данного показателя у лиц референтной группы (критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$) и составила $2,81 \pm 0,26$ и $0,25 \pm 0,07$ ммоль/л соответственно. oГци был

повышен только у 9 пациентов (выше 12 мкмоль/л), однако по сравнению с лицами референтной группы у пациентов с активацией внутрисосудистого свертывания значения оГци были достоверно выше (критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$). По результатам кластерного анализа обследуемые пациенты были разделены на 2 группы – 26 (9 мужчин и 17 женщин) и 12 (3 мужчины и 9 женщин) человек соответственно. В Кластере 1 оказались пациенты с умеренно повышенным D-димером, и значения данного показателя были достоверно ниже более чем в 2 раза, чем у пациентов, попавших в Кластер 2, где концентрация D-димера была равна $1962,7 \pm 104,0$ нг/мл. Достоверно различались между кластерами также значения концентрации глицина (в Кластере 1 ниже на 35%, Манна-Уитни, $p < 0,05$). Интересны данные корреляционного анализа при сравнении двух кластеров. У пациентов первой группы между значениями D-димера и оГци наблюдается отрицательная связь средней силы ($r = -0,42$; $p < 0,05$), в то время как во втором кластере уровень D-димера имел положительную статистическую связь с концентрацией лактата ($r = 0,61$; $p < 0,05$). По-видимому, умеренное повышение уровня D-димера у лиц Кластера 1 является результатом активации фибринолиза в рамках адекватного организма в условиях патологии, и не связано с развитием эндотелиальной дисфункции. У пациентов же с выраженным повышением D-димера активация фибринолиза сопровождается усилением продукции лактата, что косвенно указывает на более выраженное нарушение функционирования и эндотелия, и митохондрий у лиц данной группы.

Выводы. В результате комплексной статистической обработки данных выявлено, что более выраженному нарушению функционирования митохондрий соответствует более тяжелая степень эндотелиальной дисфункции. Полученные данные демонстрируют информативность и диагностическую ценность комплексного анализа кандидатных

метаболитов плазмы крови, как альтернативы распространенной сегодня в медицине ориентации на поиск узкоспецифичных единичных маркеров.

А.О. Безушко
**ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ АНАЛИЗА NO И
НИТРОЗОТИОЛОВ В МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРАХ И СЛОЖНОЙ МАТРИЦЕ
БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗЦА**

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

Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет,
Санкт-Петербург, Россия

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург, Россия

nw-e005@mail.ru

Введение. В последнее время ни у кого не вызывает сомнений необходимость разработки сильных методов количественного определения NO в биологических матрицах. Связано это как с огромной физиологической ролью молекулы NO, являющейся важнейшей молекулой-месенджером и маркером воспалительных процессов в организме, так и со сложностями инструментального определения NO. В то же время любой инструментальный метод требует оценки его аналитических параметров для успешного и продуктивного использования.

Цель. Целью данной работы явилась оценка аналитических параметров анализа NO в проточно-инжекционной системе с флуориметрическим детектированием.

Материалы и методы. В исследовании использовали раствор DAF-2 в DMSO, буферный раствор (pH=6.86), матрицу биологического образца. Детектирование использовали флуоресцентное.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования модельных растворов нитрозоглутатиона была получена калибровочная прямая. Было проведено определение содержания оксида азота (II) и нитрозотиолов в сложной матрице биологического образца. Установлено, что анализ необходимо проводить не сразу после УФ-облучения реакционной системы. Необходима инкубация проб в течение 1 часа.

Выводы. В результате исследования была проведена оценка аналитических параметров анализа оксида азота (II) и нитрозотиолов в модельных растворах и сложной матрице биологического образца.

Ю.В. Картышкина, М.О. Новак
**ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ КАК ФАКТОР СНИЖЕНИЯ
ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ АКТИВИРОВАННОМ
ВНУТРИСОСУДИСТОМ СВЕРТЫВАНИИ**

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

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург, Россия

juliana911@rambler.ru

Введение. Активация внутрисосудистого свертывания (АВС), тестируемая по уровню D-димерных фрагментов деградации фибрина, является прогностическим признаком развития угрожающих жизни состояний. Вместе с тем, показатель содержания D-димера не дает достаточно информации для оценки выраженности эндотелиальной дисфункции (ЭД) и функционального состояния системы фибринолиза, что важно для назначения индивидуальной терапии.

Цель. Оценить выраженность ЭД и нарушения фибринолиза при АВС.

Материалы и методы. Исследовано 50 образцов плазмы крови пациентов с АВС. Концентрацию D-димера оценивали количественно иммунотурбидиметрическим методом. В исследование включены образцы с уровнем D-димера > 500 нг/мл. Общий гомоцистеин (оГци) в качестве маркера ЭД определяли ВЭЖХ-анализом. Параметры коагуляции и фибринолиза оценивали турбидиметрическим методом. В качестве контроля исследовано 15 образцов пуловых плазм здоровых лиц.

Результаты и обсуждение. Гипергомоцистеинемия (оГци > 10 мкМ) отмечена у 25 пациентов (50%). В этой группе лаг-период фибринолиза и наблюдаемый лизис были продолжительнее, чем у здоровых лиц. Отмечены достоверные прямые корреляционные связи уровня оГци и длительности обеих этапов фибринолиза. У пациентов с нормальным уровнем оГци времена фибринолиза были достоверно укорочены по сравнению с показателями здоровых лиц.

Выводы. Снижение активности фибринолиза при АВС может быть связано с ЭД, проявляющейся гипергомоцистеинемией.

Е.Г. Маевская

**МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ
У ПАЦИЕНТОВ С НОРМАЛЬНЫМ УРОВНЕМ ВИТАМИНА В12 И
ДЕФИЦИТОМ МЕТИЛМАЛОНИЛ-СОА МУТАЗНОГО ПУТИ**

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург, Россия

katya-mayewskaia@mail.ru

Введение. С возрастом наряду с эндотелиальной дисфункцией развивается и митохондриальная (МД), которые лежат в основе развития сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. Один из вариантов МД встречается при недостаточности витамина **В12**. У лиц пожилого возраста кобаламиновая недостаточность проявляется гипергомоцистеинемией и метилмалоновой ацидезией (ММА).

Цель. Целью исследования являлось изучение влияния нарушения анаэробного пути образования сукцината на развитие МД.

Материалы и методы. Исследовали 32 образца плазмы крови лиц пожилого возраста, страдающих сердечно-сосудистой патологией. МД оценивали по содержанию лактата в плазме крови. Методом ВЭЖХ-анализа определяли метилмалоновую кислоту (ММК), спектр аминокислот и общий гомоцистеин (оГци). Концентрацию витамина **В12** определяли ИФА-методом. А уровень лактата определяли спектрофотометрическим способом при длине волны 340 нм. В качестве группы сравнения использовали 12 образцов плазмы крови здоровых лиц в возрасте от 30 до 40 лет.

Результаты и обсуждение. Уровень витамина **В12** плазмы крови был в пределах референтных границ нормы и составил $440,9 \pm 53,8$ пМ. При этом была выявлена ММА ($4,3 \pm 0,8$ мкМ), что свидетельствовало о недостаточной функции кобаламин-зависимой метилмалонил-СоА-мутазы. Содержание оГци в плазме крови было также повышено в среднем составило $13,5 \pm 1,2$ мкМ. Но при этом концентрации разветвленных аминокислот не изменялись. В данной группе пациентов выявлена лактацидемия ($1,74 \pm 0,25$ мМ) по сравнению с контрольной группой

($p < 0,05$). При проведении корреляционного анализа выявлена зависимость между показателями МД, такими как лактат, аланин и анаплеротическими источниками сукцината (треонин, метионин, изолейцин) ($p < 0,05$).

Выводы. У лиц старше 55 лет митохондриальная дисфункция сопровождается нарушением анаплеротического пути образования сукцината при недостаточной функции метилмалонил-СоА-мутазы. Для оценки ***V12*** состояния в организме необходимо также определять уровень метилмалоновой кислоты в плазме крови, так как это позволяет подобрать более адекватную дозу.

Т.Е. Морозова¹, Г.В. Каракашев¹, Н.В. Криворотова¹, Е.И. Савельева¹,
И.Н. Околов², Ю.В. Тахтаев²

**ВЭЖХ-МС ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ФТОРХИНОЛОНОВОГО РЯДА
ВО ВЛАГЕ ПЕРЕДНЕЙ КАМЕРЫ ГЛАЗА У БОЛЬНЫХ С КАТАРАКТОЙ**

(научный руководитель - д.х.н. Е.И. Савельева)

1. ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»
ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
2. СПб филиал ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздравсооразвития
России, Санкт-Петербург, Россия
t-morozova07@yandex.ru

Введение. Одной из основных задач, стоящих перед клинической фармакологией, является поддержание оптимальной концентрации лекарственного средства в месте воздействия необходимое для оптимизации фармакотерапии [1]. Для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений в офтальмохирургии, важной задачей является рациональный выбор антибактериального препарата (АБП) и его дозировки. В связи с этим создание высокопроизводительной и простой методики количественного определения АБП в биопробе, позволяет работать с минимальным ее объемом и является чрезвычайно актуальной задачей.

Цель. Разработка и апробация на практике мониторинга истинного количества АБП фторхинолонового ряда в содержимом передней камеры глаза у больных с катарактой; наработка фактического материала по результатам мониторинга.

Материалы и методы. Определение концентрации АБП фторхинолонового ряда во влаге передней камеры глаза проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС).

Результаты и обсуждение. Особенностью анализа проб содержимого передней камеры глаза у больных с катарактой, является необходимость достижения низких пределов обнаружения целевых веществ, что при традиционных подходах затруднительно ввиду малого количества анализируемого образца и вследствие этого невозможности проведения

процедур концентрирования. Метод ВЭЖХ-МС обладает высокой чувствительностью и селективностью и допускает анализировать биожидкости без концентрирования и очистки [2], при этом отсутствие пробоподготовки позволяет избежать потерь целевых веществ. Анализ проводили по избранным ионам: m/z 362 для левофлоксацина и m/z 402 для моксифлоксацина. Достижимый предел обнаружения составил 25 нг/мл для обоих веществ. Разработанная методика позволяет осуществлять сравнительную оценку эффективности ряда АБП фторхинолонового ряда для профилактики послеоперационных осложнений в офтальмохирургии, а также подобрать оптимальные дозировки антибактериальных капель, которые в настоящее время применяются как для лечения, так и профилактики.

Выводы. Разработана методика ВЭЖХ-МС для определения концентрации АБП фторхинолонового ряда во влаге передней камеры глаза необходимая в современной офтальмологии, которая позволяет повысить эффективность и безопасность в профилактическом применении современных АБП препаратов.

Список литературы

1. Астахов С.Ю., Вохмяков А.В. Офтальмологические фторхинолоны в лечении и профилактике глазных инфекций // Copyright “РМЖ (Русский Медицинский Журнал)” 2006-2011.
2. Vishwanathan K., Bartlett M.G., Stewart J.T. Determination of moxifloxacin in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry// Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis - 2002. – V.30. – P. 961-968.

М.О. Новак, Ю.В. Картышкина
**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ S-НИТРОЗОТИОЛОВ В
СЛЮНЕ**

(научные руководители - д.м.н., проф. Т.Ф. Субботина, д.м.н., проф. А.И. Яременко)
Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад.И.П. Павлова,
Отдел биохимии НИЦ, кафедра хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии,
Санкт-Петербург, Россия

margarita-novak@yandex.ru

Введение. Метаболизм оксида азота (II) (NO) в организме человека имеет сложную компартментализацию и два альтернативных источника. Взаимодействие NO с SH-группами белков и низкомолекулярных соединений приводят к образованию S-нитрозотиолов (RSNO) - мобильного депо NO. Тогда как регенерация из нитратов и нитритов невозможна без участия микробной нитратредуктазы. Снижение активности эндотелиальной NO-синтазы и недостаток продукции NO (вазодилатор) ассоциируется с артериальной гипертензией (АГ). С другой стороны, NO и RSNO могут быть источниками дополнительных количеств сильных окислителей. Таким образом, определение всех упомянутых азотистых веществ в слюне может иметь как системное (эндотелиальная дисфункция, сердечно-сосудистые заболевания), так и местное (поражаемость кариесом, риск периодонтитов) патогенетическое значение.

Цель. Определить концентрации RSNO в слюне исследуемой группы и сопоставить полученные данные с показателями их стоматологического статуса и маркерами предрасположенности к АГ.

Материалы и методы. Обследовано 25 соматически здоровых лиц обоего пола в возрасте 18-25 лет с различным стоматологическим статусом. Сбор слюны проводили без стимуляции в дневное время после 2-3-часового голодания. Определение NO и RSNO проводили флуориметрически в проточно-инжекционной системе с использованием флуоресцентного зонда DAF-2 и S-нитрозоглутатиона в качестве калибратора. Измерение артериального давления проводили утром после сна, в положении лежа.

Результаты и обсуждение. Методика флуориметрического определения NO и RSNO в проточно-инжекционной системе адаптирована для исследования слюны.

Выводы. Полученные данные позволяют рассматривать количественную оценку RSNO в слюне в качестве неинвазивной лабораторной технологии диагностики вазомоторной эндотелиальной дисфункции.

Е.В. Новикова
**ПРОДУКТЫ NO-СИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ
ДИСФУНКЦИЯ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

(научный руководитель - к.м.н. Н.А. Филиппова)

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
кафедра госпитальной терапии, Отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург, Россия

novikova8-44@mail.ru

Введение. Аутоиммунное воспаление у больных ревматоидным артритом (РА) способствует нарушению практически всех функций эндотелия (ангио- и васкулогенез, тромборезистентность, адгезия лейкоцитов, регуляция тонуса сосудов). Значимый компонент дисфункции - нарушение активности NO-синтаз (эндотелиального и индуцибельного типа), приводящее не только к нарушению регуляции сосудистого тонуса, но и развитию оксидативного повреждения эндотелиальных клеток вследствие повышения продукции пероксинитрита и нитрозотиолов.

Цель. Изучение активности дисфункции NO-синтаз у больных РА

Выводы. Наиболее важную роль в развитии перечисленных повреждений играют повышение экспрессии и активация синтазы индуцибельного типа (iNOS), развивающиеся под действием ФНО-альфа и провоспалительных цитокинов, а также синовиальной гипоксии. У больных РА выявляется повышение суммарного количества нитратов и нитритов (NOx) в крови и синовиальной оболочке, а также нарастание продукции пероксинитрита. Последнее приводит к активизации процессов перекисного окисления липидов (соответственно, уровню малонового диальдегида), что способствует дальнейшему нарушению не только функций эндотелия, но и развитию других патологических процессов, в частности, воспалительного остеопороза. Выявлено раннее (120 минут после инфузии), но достоверное достоверное снижение сывороточного уровня нитратов, нитритов и NOx на фоне введения инфликсимаба. Таким образом, продукты NO-синтазной активности могут рассматриваться не только как активный участник патогенеза РА, но и как перспективный ранний маркёр эффективности биологической терапии.

Е.А. Сазонова, Е.Д. Волков, А.А. Азизов
**СОСТОЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ СОЧЕТАННОЙ
ФОРМЕ ПАТОЛОГИИ ПЕРИАПИКАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ И ПАРОДОНТА**

(научный руководитель - д.м.н., А.В. Бабичев)

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

bio-sam@yandex.ru

Введение. Воспалительно-деструктивные процессы в периапикальных тканях и пародонте, продолжает оставаться серьезной стоматологической проблемой, что может привести к преждевременной потере зубов, нарушением жевательной и речевой функций.

Цель. Целью данной работы являлась оценка регуляторных и метаболических процессов в тканях полости рта по показателям ротовой жидкости у пациентов при сочетанной патологии.

Материалы и методы. Объектом исследования служила ротовая жидкость пациентов с хроническим периапикальным периодонтитом, сочетающимся с хроническим генерализованным пародонтитом, и лиц контрольной группы, у которых на момент исследования не было признаков стоматологической патологии, а также острых форм соматических заболеваний. Структурированность ротовой жидкости оценивали по её оптической плотности [1]. Определение рН и окислительно-восстановительного потенциала проводилось на рН-метре рН Meter MP 220 фирмы "Mettler Toledo", электропроводности - на кондуктометре Conductivity Meter (ТУРО: ОК-102/1). В ротовой жидкости на анализаторе «Hitachi-902» с ионоселективным блоком определяли содержание белка, креатинина, мочевины, мочевой кислоты, глюкозы, кальция, железа, натрия, калия и хлора, активность лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы. Концентрацию паратгормона, С-пептида коллагена, остеокальцина проводили на электрохемилюминесцентном анализаторе «Elecsys 2010».

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что при сочетанной форме патологии изменяются электрохимические

характеристики ротовой жидкости: на 32,4 % ($p < 0,05$) возрастает электропроводимость ротовой жидкости, на 63,5% ($p < 0,01$) снижается значение окислительно-восстановительного потенциала. При этом изменяется и её структурированность, о чем свидетельствует увеличение на 40,1 % ($p < 0,05$) показателя оптической плотности. Определение показателей обмена выявило, что содержание общего белка возрастает (+29,3%, $p < 0,05$), глюкозы – снижается на 73,3 % ($p < 0,01$), происходит существенное увеличение активности лактатдегидрогеназы (+60,2 %, $p < 0,01$), значительно повышен уровень железа (+305,9 %, $p < 0,001$), а содержание натрия снижено (-24,5 %, $p < 0,05$). Исследования показателей, отражающих состояние процессов обмена соединительной ткани показали, что в ротовой жидкости пациентов с сочетанной формой патологии по сравнению с лицами контрольной группы значительно возрастает активность щелочной фосфатазы (+381,7 %, $p < 0,001$). У них выше содержание в ротовой жидкости С-телопептида коллагена (+150,0 %, $p < 0,01$), остеокальцина (+130,9 %, $p < 0,01$) и паратгормона (+9,4 %, $p < 0,05$).

Выводы. Таким образом, у пациентов с патологией периапикальных тканей и пародонта имеются определенные изменения в показателях, отражающих состав и физико-химические параметры ротовой жидкости, что, по-видимому, является отражением как изолированного, так и сочетанного патологического процесса.

Список литературы

1. Структурные свойства слюны при моделировании кариесогенной ситуации / В.К. Леонтьев, М.В. Галиулина, И.В. Ганзина и др. // Стоматология.1996. No 2.С. 9-11.

М.Т. Фалькова, Л.Н. Москвин, М.О. Пушина
**ЦИКЛИЧЕСКОЕ ИНЖЕКЦИОННОЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ
РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ**

(научный руководитель - д.х.н. А.В. Булатов)

Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет, Санкт-Петербург, Россия

albina_my_mail@mail.ru

Введение. Флавоноиды являются биологически активными веществами. Флавоноиды входят в состав многих препаратов растительного происхождения, к которым в настоящее время проявляется пристальное внимание, как к наиболее безопасным лекарственным средствам.

Цель. Разработка автоматизированной методики определения флавоноидов в растительном сырье в условиях циклического инъекционного анализа.

Материалы и методы. Для автоматизации методики определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье использовался циклический инъекционный анализатор собственного производства.

Результаты и обсуждение. Известные ручные фотометрические методики определения содержания флавоноидов [1], основанные на реакциях образования комплексов с ионами алюминия или железа (III), ограниченно пригодны для выполнения массовых анализов, так как лежащие в их основе фотометрические реакции являются кинетически замедленными. Минимизировать кинетические ограничения при образовании аналитических форм можно за счет проведения фотометрических реакций в мицеллярных средах. До настоящего времени эта возможность улучшения аналитических характеристик методик определения флавоноидов еще не была изучена. Также по своей химической природе флавоноиды - неустойчивые соединения, поэтому для их определения предпочтительны автоматизированные методики анализа, исключая длительные многостадийные процедуры пробоподготовки. Разработана автоматизированная методика спектрофотометрического

определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье, включающая стадию экстракционного выделения флавоноидов с последующим их детектированием по реакции образования окрашенных комплексов с ионами алюминия в мицеллярных средах катионных поверхностно-активных веществ в условиях циклического инъекционного анализа [2]. Предел обнаружения составил 130 мкг/л в пересчете на рутин при массе пробы 0,1 г, время одного определения – 8 мин.

Выводы. Разработанная автоматизированная методика позволила сократить время проведения фотометрической реакции в 10 раз и адаптировать определение содержания флавоноидов для массовых анализов.

Авторы выражают благодарность РФФИ (Грант 10-03-00007-а) за финансовую поддержку.

Список литературы

- [1] Государственная фармакопея XI изд. М.: Медицина. Вып 2. 1990.
- [2] A.V. Bulatov, A.L. Moskvina, L.N. Moskvina, A.V. Mozhuhin. Flow Injection Anal. V. 27. No. 1. P. 13. (2010).

Г.Р. Шабанова, О.И. Кунина, Н.С. Паскарь
**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЗГОВОГО НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА И
КАРДИОСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТРОПОНИНА У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ
ПЛАСТИКИ АНЕВРИЗМЫ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА**

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

ФГБУ «ФЦ сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

Shgr81@yandex.ru

Введение. Аневризма левого желудочка (АЛЖ) является одним из наиболее частых и грозных осложнений трансмурального инфаркта миокарда. Частота формирования АЛЖ варьирует и составляет от 5 до 35%. Хирургическое лечение пациента с наличием АЛЖ является единственным методом, направленным на устранение АЛЖ и нормализацию геометрии ЛЖ.

Цель. Оценить динамику тропонина и мозгового натрийуретического пептида плазмы крови (BNP) после хирургической коррекции АЛЖ в раннем послеоперационном периоде и во втором полугодии после операции.

Материалы и методы. Обследованы 18 пациентов мужского пола, средний возраст на момент операции составил 54,3 года. У 11 из включенных в исследование пациентов имелся III–IV функциональный класс ХСН, у большинства пациентов были проявления стенокардии высокого ФК. Толерантность к физической нагрузке была снижена, что подтверждалось результатами теста шестиминутной ходьбы (ТШХ) - $372,6 \pm 93,5$ м. Проводили измерение исходных уровней BNP до операции, затем через 24 часа и на 7-е сутки после операции и через 6-8 месяцев после выписки. Для определения степени повреждения миокарда наряду с BNP определяли так же исходную концентрацию Tn I до операции и через 24 часа после проведения пластики АЛЖ. Уровень BNP и TnI определяли на автоанализаторах «Abbott», США, используя реагенты производителя.

Результаты и обсуждение. В результате операции у всех пациентов уменьшился объем ЛЖ, улучшилась сократимость миокарда ЛЖ, у всех больных отсутствовала клиника стенокардии напряжения и уменьшились

проявления сердечной недостаточности. Исходно показатель BNP превышал нормальный уровень у всех пациентов в группе и составил в среднем $215,0 \pm 233,4$ пг/мл (при норме до 100 пг/мл согласно рекомендациям производителя). На первые сутки после операции отметили значимый рост концентрации BNP до 676,7 пг/мл. На 7-е сутки после операции определялась тенденция к снижению показателя так же у всех пациентов в среднем до $409,1 \pm 281,1$ пг/мл. Во втором полугодии после операции уровень BNP в среднем составил $165,2 \pm 92,7$ пг/мл, что ниже исходных значений. У 7 пациентов наблюдали нормализацию уровня BNP.

Исходно уровень Tn I у всех пациентов составил менее 0.04 нг/мл (верхний референсный интервал 0.4 нг/мл). Через 24 ч. у всех пациентов отмечалось значительное повышение концентрации Tn I. Разброс значений составил от 2,04 нг/мл до 9,51 нг/мл. Повышение концентрации Tn I связывали с характером и объемом операции (пластикой аневризмы левого желудочка). В контрольной группе выполняли операцию аорто-коронарного шунтирования у больных с ИБС без проявлений ХСН в плановом порядке. Уровень тропонинемии через сутки после операции не превышал 3,0 нг/мл. Таким образом, степень повреждения кардиомиоцитов у больных, оперированных по поводу АЛЖ, была закономерно выше, чем при выполнении стандартной операции аорто-коронарного шунтирования.

Выводы. Влияние уровня BNP до оперативного вмешательства и через сутки после его выполнения на прогноз заболевания у данной категории больных требует наблюдения за пациентами в течение нескольких лет с анализом клинического статуса, характера медикаментозной терапии, что будет являться дальнейшей задачей исследования. Необходимо выработать специальные нормативные показатели кардиоспецифических тропонинов в сравнении с другими группами оперированных на сердце больных для выявления

интраоперационного повреждения миокарда и разработки новых методов защиты миокарда до и во время выполнения оперативного вмешательства.

ГТ ГАЛА - ТРЕЙД
WWW.GALATRADE.RU



Химические реактивы
Стандартные образцы
Все для хроматографии
Аналитические приборы
Лабораторное оборудование

**193231, г. Санкт-Петербург,
 ул. Латышских Стрелков д. 31 оф. 501А
 Тел./Факс: (812) 448-91-09
 E-mail: info@galatrade.ru**



www.galatrade.ru

REDA

REDA

REDA

REDA

REDA

REDA



Раздел III

Тексты опубликованных работ, выполненных в
Отделе биохимии НИЦ СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова на тему:
«Современные аналитические технологии в клинической биохимии»

1. Жлоба А.А., Маевская Е.Г. Дисфункция анаплеротического пути энергетического метаболизма от аминокислот к сукцинату у лиц старшей возрастной группы // Артериальная гипертензия. – 2011. – Т. 17, № 1. – С. 74-78.
2. Субботина Т.Ф., Жлоба А.А., Лупан Д.С., Богова В.А., Кушелева О.А. Модулирование фибринолиза основными карбоксипептидазами крови // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т.1, № 33. – С. 75-79.
3. Никитина В.В., Маевская Е.Г., Скоромец А.А., Баранцевич Е.Р. Клиническое наблюдение пациентки с дефектом гена метилентетрагидрофолат редуктазы, страдающей цереброваскулярной болезнью, гипергомоцистеинемией // Неврологический журнал. – 2009. – №4. – С. 32-33.
4. Кучер М.А., Станевич О.В., Ганапиев А.А., Субботина Т.Ф., Жлоба А.А., Афанасьев Б.В. Аминокислотный профиль плазмы крови – метод ранней диагностики изменений нутритивного статуса пациентов с высокодозной полихимиотерапией и трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток // Ученые записки СПбГМУ. – 2010. – Т17, №4. – С.20-23.

А.А. Жлоба, Е.Г. Маевская
**ДИСФУНКЦИЯ АНАПЛЕРОТИЧЕСКОГО ПУТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
 МЕТАБОЛИЗМА ОТ АМИНОКИСЛОТ К СУКЦИНАТУ У ЛИЦ СТАРШЕЙ
 ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ**

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова,
 Санкт-Петербург, Россия
Zhloba@mail.spbnit.ru, 8-(812)-499-71-08

Резюме: Показано, что митохондриальная дисфункция у лиц старше 55 лет может прогрессировать за счет нарушений анаплеротического пути, протекающего с образованием метилмалоновой кислоты. Гипергомоцистеинемия и метилмалоновая ацидемия у этих лиц сопровождается сниженным уровнем аминокислот валина, лейцина и повышением уровня метионина. Системные митохондриальные нарушения зависят от активности метилмалонил-*CoA*-мутазы, ее кофермента аденозилкобаламина, факторов его переноса в митохондрии. Это состояние обозначено в работе как анаплеротическая дисфункция. У лиц старшей возрастной группы эта дисфункция отличается от нарушения анаплероза у взрослых с функциональным дефицитом витамина B_{12} . Обычно при метилмалоновой ацидемии наблюдается повышение уровня разветвленных аминокислот. В работе сделано заключение о том, что анаплеротическая дисфункция может рассматриваться в качестве одной из причин возникновения и развития артериальной гипертензии.

Ключевые слова: анаплеротическая дисфункция, метилмалоновая ацидемия, аминокислоты, гомоцистеин, кобаламин.

The dysfunction of anaplerotic pathway of energy metabolism from amino acids to succinate in the elderly

A.A. Zhloba^{1,2}, E.G. Mayevskaya¹

1 Pavlov St Petersburg State Medical University, Biochemistry Department, St Petersburg, Russia

2 Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St Petersburg, Russia

Corresponding author: Pavlov St Petersburg State Medical University, 6/8 L. Tolstoy st., St Petersburg, Russia, 197022. Phone: 8 (812) 499-71-08.

E-mail: Zhloba@mail.spbnit.ru (Alexander A. Zhloba, MD, PhD, Professor, the Head of the Biochemistry Department of Research Centre of Pavlov St Petersburg State Medical University, the Head of the Proteomics Group of the Molecular Biology and Genetics Institution at Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract: Mitochondrial dysfunction is shown to develop progressively in people older than 55 years due to anaplerotic pathway disturbances accompanied by methylmalonic acidemia. Hyperhomocysteinemia and methylmalonic

acidemia are accompanied by decrease of valine and leucine, and methionine elevation. Systemic manifestations of mitochondrial dysfunction depend on the methylmalonyl-CoA-mutase activity, and the adenosylcobalamine, as a cofactor and the others proteins defi ned, as transporters of the cofactor. This metabolic state was defi ned as an anaplerotic dysfunction in the paper. The discussed metabolic dysfunction in elderly people differs from the one in adults with Vitamin B12 functional defi ciency. The elevation of branched chain amino acids is usually observed in methylmalonic acidemia. We conclude that anaplerotic dysfunction should be considered a possible factor of initiation and progression of arterial hypertension.

Key words: anaplerotic dysfunction, methylmalonic acidemia, amino acids, homocysteine, cobalamin.

Статья поступила в редакцию: 29.12.10. и принята к печати: 24.01.11.

Введение. Недостаточно эффективное окисление субстратов в ткани приводит к увеличению в ней кровотока. Показано, что снижение эффективности энергетического метаболизма в митохондриях периферических тканей вызывает системную артериальную гипертензию [1]. Известно также, что так называемые митохондриальные гены вовлечены в возникновение и прогрессирование артериальной гипертензии [2]. Как известно, при снижении скорости образования щавелевоуксусной кислоты за счет метаболизма глюкозы возникает усиление образования интермедиатов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) из других источников в ходе реакций, объединяемых термином – анаплероз (от греч. - пополнение). В частности, к значительным источникам интермедиата ЦТК - сукцината относятся аминокислоты - валин, изолейцин, метионин [3] и жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов [4]. В мышечных тканях этот путь может рассматриваться, как важный источник интермедиатов ЦТК, поскольку белки актомиозинового комплекса содержат большие количества указанных выше аминокислот [5]. Этот важный путь анаплероза может нарушаться в связи с: 1) недостаточностью количества синтезируемых ферментов или общего количества митохондрий в клетке, 2) генетическими нарушениями

образования зрелых молекул всех белков, включая ферменты, этого пути [6], 3) недостатком поступления и образования в митохондриях коферментной формы витамина B_{12} . Изучение пропускной способности анаплеротического пути, протекающего с участием метил-малонил-СоА-мутазы (ММК-мутаза) с образованием его интермедиата – метилмалоновой кислоты (ММК) позволит оценить способность клетки восполнять дефицит образования интермедиатов ЦТК из источников альтернативных глюкозе. Состояние этого пути при различных патологических состояниях, включая артериальную гипертензию, изучено недостаточно. У гипертоников зрелого возраста различные проявления митохондриальной дисфункции могут приводить к энергетической недостаточности мышечной ткани и других богатых митохондриями тканей. Сведения о состоянии источников анаплеротических путей и их ключевого промежуточного звена ММК-мутазной реакции в литературе отсутствуют. Не представлены сведения об уровне маркера митохондриальной дисфункции - молочной кислоты у пациентов с метилмалоновой ацидемией (ММА) при отсутствии дефицита витамина B_{12} в крови, из которого образуется кофермент аденозиокобаламин, включающийся в состав ММК-мутазы.

Целью настоящего исследования являлось сопоставление плазменного пула аминокислот источников ММК и уровня ММА с оценкой митохондриальной дисфункции у гипертоников старше 55-летнего возраста с нарушениями кровообращения. Представлял интерес также уровень аминокислоты глицина, катаболизм которого является митохондриальным B_9 -зависимым процессом, катализируемым глицин-декарбоксилазным комплексом. Этот надмолекулярный комплекс белков весьма чувствителен к состоянию митохондрий и уровню поступающего в них метилентетрагидрофолата [7]. На основе полученных данных представлялась важной формулировка возможного подхода к нутритивной

поддержке при митохондриальной дисфункции осложненной нарушением анаплероза с учетом индивидуального аминокислотного пула.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе клиник СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. Критериями для включения образцов в анализ были: возраст старше 55 лет, наличие сердечно-сосудистых заболеваний (Табл. 1) при содержании витамина B_{12} в плазме крови в пределах референтных границ нормы от 133 до 675 пМ (тест система Westan Coulter). Критерием взаимосвязи анаэробной и аэробной фаз энергетического метаболизма в митохондриях служил уровень молочной кислоты в плазме крови пациентов.

Материалом ретроспективного исследования послужили 9 образцов плазмы крови от пациентов обоего пола. Основные данные, характеризующие пациентов, представлены в табл. 1. У большинства из них, по данным историй болезни уровень систолического/диастолического артериального давления составлял $139\pm 2,0/89\pm 2,9$ мм рт. ст. Из другой соматической патологии встречались осложнения со стороны функции почек, нарушение толерантности к глюкозе, явления мальабсорбции фолатов, но не витамина B_{12} . Отметим также у них невыраженный характер анемии, что не давало ясных указаний к интенсивности фармакотерапии витаминами B_{12} и B_9 .

ВЭЖХ-анализом [8], в нашей модификации с использованием хроматографа фирмы Agilent – 1100 с флуориметрическим детектированием исследовали ММК в модификации (разрешение на применение модифицированной диагностической технологии: «Лабораторная диагностическая технология выявления метилмалоновой ацидемии», А.А. Жлоба, Е.Г. Маевская, В.В. Никитина, №ФС2010/122, 02.04.10). Спектр аминокислот стандартным ВЭЖХ-анализом с дохроматографическим получением их производных ортофталевого альдегида [9] и фотометрическим детектированием (разрешение на

применение модифицированной диагностической технологии: «Лабораторная диагностическая технология определения спектра альфа-аминокислот в плазме крови», авторов А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, №ФС 2010/316 от 31.08.10). Общий гомоцистеин (оГци) анализировали, как описано в работе [10], (разрешение на применение модифицированной диагностической технологии: «Лабораторная диагностическая технология выявления гипергомоцистеинемии», А.А. Жлоба, Э.Л. Блашко, В.В. Никитина, №ФС № 2009/309 от 04.09.09). Уровни витаминов B_{12} и фолиевой кислоты определяли методом ИФА - анализа с использованием анализатора «Access-2» и наборов фирмы «Becton Coulter».

Статистическая обработка проведена с использованием лицензионной программы SPSS15. Данные выражали в виде средних арифметических и их средних ошибок. Сравнение полученных данных с имеющимися в литературе данными [11,12,13], осуществляли с использованием критериев знаковых рангов Вилкоксона. Корреляционным анализом по Спирмену изучали тесноту связи показателей внутри изученной группы.

Результаты исследования. Согласно данным, представленным в табл. 1 все пациенты старше 55 лет, у которых были проанализированы образцы плазмы крови, имели выраженные нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы, и не имели нарушений поступления в организм витамина B_{12} , так как уровень последнего во всех случаях был в пределах референтного интервала нормы и составлял в среднем $248,5 \pm 31,8$ пМ. По данным анализов лактата у пациентов старше 55 лет отмечалась умеренная лактоацидемия на уровне $0,95 \pm 0,11$ мМ - примерно в 2 раза превышавшая ($p < 0,05$) средний уровень лактата $0,46 \pm 0,07$ мМ у здоровых доноров 25-40 летнего возраста ($N=12$).

Таблица 1

Характеристика группы пациентов (n=9)

Показатели	Средние значения (M ± m)
Мужчины/женщины	2/7
Возраст, лет	69,8±3,2
АД систол, мм рт. ст.	139±2
АД диаст., мм рт. ст.	89±2,9
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	3,8±0,3
Гемоглобин, г/л	110,7±4,7
Сердечно-сосудистые заболевания	Количество (n)
- гипертоническая болезнь	9
- ишемическая болезнь сердца	6
- постинфарктный кардиосклероз	3
- нарушение ритма сердца	1
- тромбоэмболия легочной артерии	1

Повышенный уровень оГци у этих пациентов - $13,0\pm 3,6$ мкМ, при нормальном уровне его от 5 до 12 мкМ [10], свидетельствовал о недостаточной утилизации данного аминотиола. Это могло зависеть, как от функциональной нехватки витамина **B**₁₂, так и от алиментарной нехватки витамина **B**₉, содержание которого составило $8,9\pm 0,5$ нМ (табл. 2). Анализ ММК в этих же образцах показал, что, несмотря на удовлетворительный уровень витамина **B**₁₂ в плазме крови, обнаруживается дефицит активности митохондриальной ММК-мутаза [14]. Это может приводить к нарушению утилизации источников ММК, включая аминокислоты валин, изолейцин, метионин и некоторые другие. Недостаток фолиевой кислоты в митохондриях, в свою очередь, может приводить к нарушению функционирования глицин-декарбоксилазного комплекса.

Таблица 2

Метаболические маркеры нарушения коферментных функций кобаламина (витамина **B₁₂**) и фолиевой кислоты (витамина **B₉**)

Основные биохимические показатели плазмы крови	Пациенты	Референтные границы нормы в плазме крови
Общий гомоцистеин, мкМ	13,0±3,6 мкМ*	5 – 12 мкМ [10]
Метилмалоновая кислота, мкМ	2,5±0,8 мкМ*	до 0,4мкМ [16]
B12 плазмы крови ИФА-методом, пМ	248,5 ±31,8 пМ	133 – 675 пМ [с использованием тест системы фирмы Becton Coulter]
Фолиевая кислота плазмы крови Becton Coulter, нМ	8,9±0,5 нМ	>11, 8 нМ [с использованием тест системы фирмы Becton Coulter]

В изученном спектре 20 аминокислот наиболее существенные сдвиги были обнаружены в отношении метионина, глицина, изолейцина, лейцина, треонина, валина и цистеина. Уровни большинства этих аминокислот были достоверно понижены. Содержание их по сравнению с количествами в основной взрослой популяции отражено в табл. 3. Только уровень метионина был повышен почти в 2 раза, составив 59,9±11,7 мкМ, при снижении уровней других важнейших источников ММК - валина до 191,3±14 мкМ и изолейцина до 48,7±7мкМ. Несмотря на снижение указанных источников ММК и отсутствие дефицита витамина **B₁₂** в плазме крови, количество ММК было существенно выше нормы, составив - 2,5±0,8 мкМ. Полученные данные указывают на то, что уровень

аминокислот, являющихся источниками ММК, у лиц старшей возрастной группы не повышается.

Таблица 3
Аминокислоты плазмы изученных образцов крови (N=9), катаболизм которых зависит от витаминов **B₁₂**, **B₉**; (мкМ)

Аминокислоты	Пациенты (N=9)	Контрольная группа (N=22) по Gitlitz P.H. 1974 [12].	Референтные значения по Тицу [11].
Валин	191,3*±14	239±31	150-310
Треонин	16,9*±3,3	157±20	92-240
Метионин	59,9^±11,7	37±6	16-30
Лейцин	49,0*±12	137±21	66-170
Изолейцин	48,7* ±7	73±12	42-100
Глицин	254,6±13,8	245±38	170-330
½Цистин	78,7±12,86	30±3,5	33 – 117
Фенилаланин	79,3±15,08	59 ± 8	41 - 68

*-означает достоверное понижение, а ^- повышение, при $p < 0,05$ при сравнении с данными работы [12].

Другой митохондриальный процесс, зависящий от коферментной функции витамина **B₉**, с участием глицин-декарбоксилазного комплекса, обеспечивает утилизацию избытка глицина [7]. Пониженное в целом содержание фолиевой кислоты ($8,9 \pm 0,5$ нМ) в парном сравнении в изученной группе отрицательно коррелировало с уровнями валина и глицина ($p < 0,05$), подчеркивая зависимость указанных путей метаболизма одноуглеродных фрагментов от фолиевой кислоты. Содержание витамина **B₁₂** по полученным данным отрицательно коррелировало с уровнями метионина, фенилаланина и аланина ($r = -0,9$, $r = -0,78$, $p < 0,05$). Повышенный уровень метионина наряду с высоким уровнем общего гомоцистеина, возможно, свидетельствовал о заторможенных процессах метилирования с участием ферментов метилтрансфераз [15], обеспечивающих перенос

метильных групп на различные субстраты, включая белки и нуклеиновые кислоты. Это вносит вклад в снижение активности пролиферативных и репарационных процессов, возможно, и в образование белковых факторов и апоферментов, связанных с митохондриальным метаболизмом витамина B_{12} . Корреляционных связей между уровнем ММК с уровнями изученных витаминов в крови не обнаружено.

Обсуждение результатов. Возможно, что показатели изученных митохондриальных процессов в большей степени зависят не от содержания их кофакторов, а от экспрессии соответствующих апобелков, участвующих в метаболических путях и транспорте кофакторов в митохондрии. Образование сукцината из ММК является B_{12} -зависимой реакцией, катализируемой ММК-мутазой с аденозилкобаламином в качестве кофермента. ММА может развиваться, как при нарушении биосинтеза и созревания ММК-мутазы из белка, так и при нехватке готового кофактора в виде аденозилкобаламина в митохондриях.

В отличие от первичной митохондриальной дисфункции, ВМД в меньшей степени связана с генетическими мутациями [16]. Помимо мутаций может наблюдаться снижение количества необходимых белковых факторов. Другая причина ММА связана с нарушением поступления кобаламина в митохондрии и образованием его коферментной формы. В обследованной группе старше 55 лет, отмечается дефицит анаплеротического пути от аминокислот к сукцинату, проявляющийся ММА. При этом обычно при дефиците аденозилкобаламина наблюдается повышение концентрации аминокислот источников ММК в системном кровотоке. Как показано в настоящей работе эта закономерность не соблюдается в группе обследованных старше 55 лет. В данной работе выявлена ММА при нормальном содержании витамина B_{12} , что свидетельствует о формирующейся ВМД у лиц данной группы, несмотря на удовлетворительный уровень указанного источника кофермента.

Данный вид ВМД характерен для лиц старшей возрастной группы. ММА у них развивается на фоне пониженного содержания анаплеротических источников интермедиатов ЦТК. Этот тип ВМД, по видимому, может в большей степени зависеть не от дефицита витамина B_{12} , а от снижения экспрессии ферментов анаплеротического пути, включая B_{12} -зависимую ММК-мутазу.

Недостаточность B_{12} - и B_9 -зависимых процессов в рассмотренной группе пациентов обусловила также гипергомоцистеинемию. Повышение уровня метионина у данных пациентов может свидетельствовать о торможении процессов трансметилирования (феномен гипометилирования). Гипометилирование и анаплеротическая дисфункция, по-видимому, являются характерными особенностями метаболизма в старшей возрастной группе. Анаплеротическая дисфункция, выявленная у обследованных, затрагивает пути пополнения сукцината (янтарной кислоты), одного из интермедиатов ЦТК.

Анаплеротическая дисфункция у лиц старшей возрастной группы обнаруживает себя в виде значительных сдвигов в спектре промежуточных метаболитов (ММК, лактат) и источников пропионата. К ним относятся некоторые аминокислоты, $C5$ -кетоновые тела, жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода, боковая цепь холестерина, субстанции гептаноата или тригптаниона. Отчетливо проявляемая в старшей возрастной группе, анаплеротическая дисфункция может вносить свой вклад в возникновение и патогенез сердечно-сосудистых заболеваний. В соответствии с современными данными, нарушения использования субстратов энергетического метаболизма в тканях порождают сигналы к системе кровообращения с возможным возникновением артериальной гипертензии [1,2]. Таким образом, неэффективная энергетика ткани рассматривается в качестве одного из фундаментальных метаболических факторов возрастной склонности организма к развитию артериальной

гипертензии. Возможно, что для этого сигнал от тканей может быть опосредован их митохондриальной *NO*-синтазой [17].

Пополнение пула интермедиатов ЦТК за счет использования поставщиков сукцината через ММК в сердечной мышце или за счет шунта Робертса в нервной ткани может привести к усилению анаплеротической функции митохондриального метаболизма. Анаплеротический путь от аминокислот к сукцинату в клетках не является единственным способом пополнения интермедиатов ЦТК. В клетках печени и жировой ткани и других для пополнения ЦУК используется пируват-карбоксилазная реакция, которая является основным анаплеротическим путем. В мышечной ткани при утилизации аминокислот изолейцина и валина, являющихся, в том числе, продуктами деградации актомиозинового комплекса, возможно пополнение янтарной кислоты через ММК. Этот путь является важным источником ЦУК в мышечной и нервной тканях, в особенности при недостатке метаболитов глюкозы дающих интермедиаты ЦТК. Анаплеротическую дисфункцию следует оценивать посредством измерения уровней участников и кофакторов этого участка митохондриального метаболизма в крови – ММК, витамина *B*₁₂ и указанных выше аминокислот. А уровень собственно митохондриальной дисфункции - по содержанию молочной кислоты. В отличие от лиц более молодого возраста, у которых, повышена концентрация валина, изолейцина у лиц старшей возрастной группы наблюдается понижение концентрации этих аминокислот при ММА. При пониженной концентрации валина, изолейцина и достаточно высоком содержании метионина у лиц старшей возрастной группы основным источником ММК может, судя по полученным данным, являться метионин. Анаплеротическая дисфункция вносит вклад в нарушение функций митохондрий одновременно с потерей пропускной способности глицин-декарбоксилазного фолат-зависимого комплекса. Индикатором

возможного дефицита обоих кофакторов указанных процессов является гипергомоцистеинемия (ГГЦ). Адекватно уровню ГГЦ следует использовать препарат витамина **B₉**. Выявление данного изменения спектра аминокислот у лиц пожилого возраста с ВМД имеет большое значение для планирования коррекции терапии и назначения нутритивной поддержки. Эту терапию можно адекватно обеспечить при условии понимания общего торможения белок синтезирующей системы у лиц старшей возрастной группы. У них наблюдается неэффективное усвоение незаменимых аминокислот и их использование для образования белковых факторов, включая факторы транспорта витамина **B₁₂** в клетку, и синтеза его коферментной формы в митохондриях. Возможна нутритивная поддержка, включающая разветвленные аминокислоты и витамин **B₁₂** в форме аденозил-кобаламина (Cobamamidum) или гидроксикобаламина. Коррекция ММА у лиц старшей возрастной группы повышением доз витамина **B₁₂** в виде цианкобаламина может не быть достаточно эффективна из-за не соответствия коферменту ММК-мутаза.

Вывод. Анаплеротическая дисфункция наряду с эндотелиальной дисфункцией может рассматриваться в качестве одной из причин возникновения и развития артериальной гипертензии. Возможно, что нарушение аденозилкобаламин-зависимого анаплероза вносит определенный вклад в снижение эффективности окисления субстратов ЦТК. Это может включать регуляторную цепочку активизации кровообращения и увеличения потока субстратов энергетического метаболизма в ткани. При этом достигается положительный эффект в виде повышения выхода макроэргических продуктов в митохондриях, несмотря на неэффективное использование самих субстратов. Возможно, что улучшение полноты окисления субстратов энергетического метаболизма в тканях может в определенной мере способствовать снижению артериальной гипертензии.

Список литературы:

1. Постнов Ю. В., Орлов С.Н., Будников Е. Ю. и др. Нарушение преобразования энергии в митохондриях клеток с уменьшением синтеза АТФ, как причина стационарного повышения уровня системного артериального давления //Кардиология. - 2008. -Т. 48.- № 8.-С.49-59.
2. Буйкин С. В., Голубенко М. В., Пузырев В. П. Участие “митохондриальных генов” в формировании гипертрофии левого желудочка при артериальной гипертензии//Молекулярная биология. -2010.- Т. 44.-№ 1.-С. 28-32.
3. Owen O.E., Kalhan S.C., Hanson R.W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function// J. Biol. Chem. -2002.- V. 277. -№34.- P. 30409–30412.
4. Frenkel E. P. Abnormal fatty acid metabolism in peripheral nerves of patients with pernicious anemia//J. Clin. Invest.-1973.-V. 52 .- P.1237-1245.
5. Kasumov T., Cendrowski A. V., David F. Mass isotopomer study of anaplerosis from propionate in the perfused rat heart//Arch. Biochem. Biophys.- 2007. -V.463.- P.110 -117.
6. Ostergaard E., Hansen F.J., Sorensen N. et al. Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations// Brain.-2007.- V.130.- P. 853-861.
7. Lamers Y., Williamson J., Gilbert L. R. Glycine turnover and decarboxylation rate quantified in healthy men and women using primed, constant infusions of [1,2-(13)C2]glycine and [(2)H3]leucine.// J. Nutr.- 2007.- V. 137.- P. 2647-2652.
8. Babidge P.J., Babidge W.J. Determination of methylmalonic acid by high-performance liquid chromatography// Anal. Biochem. -1994.- V. 216.- P. 424–426.

9. Gratzfeld-Huesgen A. Sensitive and reliable amino acid analysis in protein hydrolysaty using the HP 1100C series HPLC// Agielent technical note. -1998-1999.- <http://ftp.neurop.ruhr-uni-bochum.de/pub/HPLC/OPA-Methode.pdf>.
10. Zhloba A.A., Blashko E.L. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection// J. Chromatogr. B. - 2004.- V. 800.-P. 275-280.
11. Тиц Н.У. Клиническая оценка лабораторных тестов// М.: Медицина.- 1986.- С. 41-57.
12. Gitlitz P.H., Sunderman F.W., Hohnadel D.C. Ion-exchange chromatography of amino acids in sweat collected from healthy subjects during sauna bathing// Clin. Chem.-1974. -V. 20.- P.1305 - 1312.
13. Polge A., Bancel E., Bellex H. et al. Plasma amino acid concentrations in elderly patients with protein energy malnutrition//Age Ageing.- 1997.- V.26.- P.457-462.
14. Светлицкая С.Г. Мегалобластические анемии // Медицина (Минск). - 2004. -№1.- С. 30-32.
15. Heil S.G., Lievers K.J.A., Boers G.H. et al. Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT): Genomic sequencing and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans// Mol. Genet. Metab.- 2000.- V.71.- P. 511-519.
16. Allen R. H., Stabler S.P., Savage D.G. et al. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency// Faseb J. -1993.- V.7. -P. 1344–1353.
17. Puddu P, Puddu G.M., Cravero E., et al. The putative role of mitochondrial dysfunction in hypertension//Clin. Exp. Hypertens.- 2007.- V 29.- №7.- P 427-34.

Т.Ф. Субботина, А.А. Жлоба, Д.С. Лупан, В.А. Богова, О.А. Кушелева
**МОДУЛИРОВАНИЕ ФИБРИНОЛИЗА ОСНОВНЫМИ
КАРБОКСИПЕПТИДАЗАМИ КРОВИ**

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

Subbotina2002@mail.ru, 8-(812)-499-71-08

Резюме: Основные карбоксипептидазы крови, включая активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАИФ), модулируют процесс фибринолиза путем отщепления С-концевых остатков аргинина и лизина от частично деградированного фибрина. Целью работы являлась разработка методики выявления активации карбоксипептидаз крови в процессе коагуляции/фибринолиза. Исследованы образцы плазмы крови пациентов с артериальной гипертензией. Коагуляцию и последующий фибринолиз инициировали добавлением стандартных количеств тромбина и тканевого активатора плазминогена. Карбоксипептидазную активность регистрировали по нарастанию количеств аргинина и лизина после завершения фибринолиза. Параметры фибринолиза оценивали турбидиметрически. После завершения фибринолиза отмечается достоверное и существенное (приблизительно двукратное) увеличение концентраций основных аминокислот, которое достоверно и отрицательно коррелирует с временем инициации фибринолиза. Это позволяет рассматривать зарегистрированную активность как один из факторов модулирования фибринолиза.

Ключевые слова: фибринолиз, основные карбоксипептидазы, аргинин, лизин.

Abstract: Blood basic carboxypeptidases including thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) can modulate fibrinolysis by removing C-terminal arginine and lysine residues from partially degraded fibrin. The goal of this investigation was the elaboration of the detection method for blood carboxypeptidase activity associated with coagulation/fibrinolysis. Plasma samples from patients with arterial hypertension were investigated. The coagulation and subsequent fibrinolysis were initiated by addition of standard doses of thrombin and tissue plasminogen activator, respectively. The carboxypeptidase activity was measured by increased levels of arginine and lysine after fibrinolysis was completed. The parameters of fibrinolysis were evaluated by clot turbidity assay. Fibrinolysis led to a large (approximately twofold) and significant increase in concentrations of basic amino acids arginine and lysine, which negatively correlated to the time of fibrinolysis initiation. Thus, the carboxypeptidase activity which we registered can be considered as one of factor modulating fibrinolysis.

Key words: fibrinolysis, basic carboxypeptidases, arginine, lysine.

Плазмин – главный фермент системы фибринолиза - является сериновой малоспецифичной эндопротеиназой, которая атакует пептидные связи своего естественного субстрата, фибрина, гидролизуя преимущественно связи Арг-Х и Лиз-Х. Таким образом, продукты деградации фибрина плазмином характеризуются большим количеством С-концевых остатков лизина и аргинина. Активация предшественника плазмина – плазминогена - в естественных условиях инициируется в ранний период плазменной коагуляции при появлении первых нитей фибрина. Фибрин обладает участками специфической сорбции плазминогена и его главнейшего активатора – тканевого активатора плазминогена (тАП). Связывание плазминогена происходит по лизиновым остаткам фибрина [6]. По мере начинающегося разрушения фибрина, появляются дополнительные участки связывания (становятся доступными новые лизиновые остатки), и процесс фибринолиза ускоряется. Считается, что этими дополнительными участками связывания могут быть С-концевые остатки лизина в составе продуктов деградации фибрина [4]. Поэтому основные карбоксипептидазы крови, отщепляя от белков С-концевые мономеры лизина и аргинина могут существенным образом модифицировать фибринолиз. Одной из наиболее изученных карбоксипептидаз является активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАИФ), или карбоксипептидаза U. ТАИФ находится в крови в виде неактивного предшественника, который активируется тромбином, комплексом тромбин-тромбомодулин или плазмином. Чистый тромбин является «плохим» активатором ТАИФ, но в комплексе с тромбомодулином активация усиливается в 1250 раз [8]. Показано, что ТАИФ замедляет фибринолиз путем отщепления С-концевых остатков лизина, тем самым лишая плазмин дополнительных участков связывания. ТАИФ отличается крайней нестабильностью и при 37°С утрачивает активность через 10-20 минут [4]. Обычно определяют ТАИФ либо

иммуноферментным методом, либо весь имеющийся в образце профермент переводят в активную форму и тестируют с использованием низкомолекулярного синтетического субстрата [9]. Эти методики оценивают концентрацию ТАИФ, но не могут дать представление о его реальном вкладе в ингибирование фибринолиза, которое может лежать в основе некоторых тромбофилий.

Нашей целью являлась разработка методики определения ассоциированной с 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*. Принимая во внимание то, что ВЭЖХ анализ, - наиболее точный метод определения аминокислот - является относительно труднодоступным в клинической лаборатории, мы решили параллельно определить концентрацию аргинина в образцах с помощью реакции Сакагучи.

Материалы и методы исследования. В работе использованы коммерческие белковые препараты: тромбин человека (ООО «Технология-Стандарт», Барнаул) и тканевой активатор плазминогена (тАП) (Actilyse). Вероналовый буфер содержал 0,02 М барбитурат натрия (веронал), 0,13 М NaCl и 1 мМ CaCl₂, pH доводили до 7,4 с помощью HCl. Все остальные реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а.

Исследованы образцы бедной тромбоцитами цитратной плазмы крови, полученной из локтевой вены натощак у 10 пациентов с артериальной гипертензией (4 мужчины и 6 женщин, средний возраст 54 года), находящихся под наблюдением в поликлинике № 31 г. Санкт-Петербурга. Исследование проводили в течение 1 часа после забора крови.

Моделирование фибринолиза. К 0,3 мл плазмы добавляли 0,5 мкг тАП в объеме 0,05 мл вероналового буфера, и через 1 минуту после этого – 0,05 мл раствора тромбина (0,125 ед. НИИ). Образовавшийся фибриновый

сгусток инкубировали на водяной бане при 37°C. После завершения лизиса (45 – 120 мин), который регистрировали визуально, среду депротеинизировали добавлением 0,4 мл 5% сульфосалициловой кислоты с последующим центрифугированием (4000 g, 20 мин). Контролем служил образец той же плазмы, инкубировавшийся параллельно с 0,05 мл буфера. Непосредственно перед депротеинизацией к нему добавляли 0,05 мл тАП.

Определение лизина и аргинина проводили на хроматографе Agilent методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с дериватизацией орто-фталевым альдегидом на колонке Zorbax Eclipse AAA C18 (200x2,1) мм. После нанесения на колонку 1 мкл супернатанта, проводили элюцию при 40°C в 40 mM натрий-фосфатном буфере, pH 7,8, градиентом ацетонитрила и метанола в соответствии с рекомендациями фирмы Agilent Technologies [7]. При расчете концентраций использовали внешний стандарт. Параллельно в тех же пробах определяли концентрацию аргинина одной из модификаций метода Сакагучи [5].

Параметры тромбин-индуцированного фибринообразования и фибринолиза, активируемого тАП, регистрировали турбидиметрическим методом [3] с использованием спектрофотометра СФ2000 на длине волны 340 нм в образце плазмы, разведенной в 20 раз вероналовым буфером. Данный метод позволяет оценить не только суммарное время фибринолиза, но и дифференцировать его, с одной стороны, на лаг-период, когда на кривой оптической плотности наблюдается плато, соответствующее сорбции плазминогена и тАП на фибрине, начальной активации плазминогена и началу деградации фибрина, и, с другой стороны, время наблюдаемого лизиса, которое сопровождается снижением оптической плотности. Важным параметром является также величина максимальной оптической плотности, которая тесно коррелирует с концентрацией фибриногена в образце.

Статистическую обработку проводили методами непараметрической статистики с использованием программы Statistica 7.0. Оценку достоверности различий проводили с помощью критерия Вилкоксона для парных наблюдений. При корреляционном анализе вычисляли ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты. Из данных, представленных в таблице, видно, что почти по всем оцениваемым показателям отмечаются значительные индивидуальные вариации. После завершения цикла коагуляции/фибринолиза отмечается достоверное увеличение концентраций аргинина и лизина в инкубационной среде. Это возрастание регистрируется не только с помощью ВЭЖХ анализа, но и более простой реакцией Сакагучи, причем результаты этих методов достоверно коррелируют между собой ($r_s=0,697$; $p < 0,05$). Увеличение концентраций аминокислот после фибринолиза весьма значительно: по данным ВЭЖХ анализа оно составляет 114 и 87% для аргинина и лизина, соответственно. Определение аргинина методом Сакагучи дает несколько меньший относительный прирост – 79%, хотя все концентрации, определенные этим методом, значительно выше, чем по данным ВЭЖХ. Исходные концентрации аргинина и лизина не коррелируют достоверно с их приростами после завершения лизиса ($r_s=0,042$ и $0,383$ для аргинина и лизина, соответственно), что позволяет более уверенно судить о выявленном эффекте как о результате активируемого в ходе фибринолиза ферментативного процесса. В то же время не выявлено ни одной достоверной корреляции максимальной оптической плотности сгустка, отражающей концентрацию фибриногена, с другими регистрируемыми параметрами.

Из параметров фибринолиза, оцениваемых турбидиметрическим методом, тесные и высоко достоверные корреляционные связи с приростом основных аминокислот (но не с их исходными

концентрациями) обнаруживаются только для показателя длительности лаг-периода: $r_s = -0,733$ и $-0,761$ для аргинина и лизина ($p < 0,05$). Следует подчеркнуть, что эти связи отрицательные; иными словами, чем быстрее запускается процесс фибринолиза, тем выше регистрируемая экзопептидазная активность.

Таблица

Варьирование параметров фибринолиза и концентраций основных аминокислот в образцах плазмы крови ($n = 10$)

Название параметра		Среднее и ошибка средней ($M \pm m$)	Минимум	Максимум
Лаг-период фибринолиза, с		526 ± 127	84	1343
Время наблюдаемого лизиса, с		704 ± 139	150	1207
Общее время фибринолиза, с		1230 ± 240	256	2580
Максимальная оптическая плотность сгустка, о.е.		$0,197 \pm 0,015$	0,141	0,265
Концентрация аргинина (реакция Сакагучи), мкМ	Контроль	$280,8 \pm 46,9$	160,8	489,6
	После лизиса	$503,7 \pm 84,6^*$	220,8	754,0
	Прирост	$222,9 \pm 56,7$	0	593,2
Концентрация аргинина (ВЭЖХ анализ), мкМ	Контроль	$82,7 \pm 12,8$	41,6	171,7
	После лизиса	$176,9 \pm 70,8^*$	63,0	792,2
	Прирост	$94,2 \pm 67,0$	2,3	692,1
Концентрация лизина (ВЭЖХ анализ), мкМ	Контроль	$114,1 \pm 11,8$	62,4	160,3
	После лизиса	$213,3 \pm 53,2^*$	81,5	609,1
	Прирост	$99,2 \pm 48,7$	19,1	479,4

*Примечания: концентрации аминокислот приведены в расчете на цельную плазму; * - достоверное отличие от уровня контроля ($p < 0,01$)*

Обсуждение результатов. Наиболее интересным результатом настоящего исследования следует считать регистрацию ассоциированного с фибринолизом освобождения значительных количеств основных аминокислот – аргинина и лизина. Выраженность этого явления достоверно коррелирует с эффективностью начальной фазы фибринолиза.

По всей вероятности, эти аминокислоты появляются в результате действия карбоксипептидаз, активирующихся в ходе фибринолиза и субстратом которых является частично деградированный фибрин. По направленности выявленного эффекта эта карбоксипептидазная активность не может быть приписана ТАИФ, поскольку в последнем случае корреляции с активностью фибринолиза были бы обратными. Возможно, в небольшой группе пациентов, обследованных нами, не встретилось таких, у которых активность ТАИФ имела бы существенное патогенетическое значение. Таким образом, короткое плато на кривой оптической плотности в сочетании с выраженным возрастанием концентрации основных аминокислот можно считать достоверным маркером активации фибринолиза, а разработанный нами метод – пригодным для дальнейшего использования. Результаты, полученные с использованием метода Сакагучи, тесно и достоверно коррелируют с данными ВЭЖХ анализа, поэтому данный метод также можно использовать, однако следует учитывать его недостатки: для получения надежных результатов необходимо большое количество материала для анализа, кроме того, этот метод всегда дает завышенные результаты. Последнее объясняется недостаточной специфичностью реакции Сакагучи: она положительна не только с аргинином, но и с другими метаболитами, содержащими гуанидиновую группу, а также с аргинином в составе коротких неосаждаемых пептидов. Следует отметить, что средние концентрации аргинина и лизина в контрольных образцах, определенные методом ВЭЖХ, соответствуют референтному интервалу нормы: аргинин 21 – 138 мкМ, лизин 83 – 238 мкМ [2].

Зарегистрированные нами в ходе фибринолиза увеличения концентраций аргинина оказались столь значительными (в среднем, двукратными), что это дает основания предположить, что в ходе фибринолиза может появляться существенная прибавка субстрата для

эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Доступность аргинина для eNOS из системного кровотока может быть существенно ограничена [1]. Дополнительное выделение аргинина в ходе фибринолиза, происходящего на поверхности эндотелия, возможно, является дополнительным источником субстрата для eNOS. Таким образом, возможно, что активно протекающий фибринолиз обеспечивает не только лизис тромба, но и способствует вазодилатации, а это является дополнительным фактором хорошего восстановления кровообращения.

Прибавка лизина в ходе фибринолиза также достаточно велика. Следует помнить о том, что лизин – незаменимая аминокислота, используемая, в частности, наряду с метионином для синтеза карнитина – переносчика жирных кислот в митохондриях, что чрезвычайно важно для энергетического обеспечения клеток.

Таким образом, проведенное нами исследование приводит к предварительным выводам о том, что возникающая в ходе фибринолиза карбоксипептидазная активность может иметь положительное значение, обеспечивая местную поставку незаменимых аминокислот, источником которых является деградирующий фибриновый сгусток.

Список литературы:

1. Жлоба А.А. Роль АДМА в качестве эндогенного ингибитора eNOS и одного из медиаторов развития вазомоторной эндотелиальной дисфункции / Жлоба А.А. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2007, № 3. – С. 4-14
2. Клиническая оценка лабораторных тестов / Под ред. Н.У. Тица: Пер. с нем. – М.: Медицина, 1986. – 480 с.
3. Субботина Т.Ф. Сорбция плазминогена на фибрине как одно из условий эффективного фибринолиза / Субботина Т.Ф. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2006, № 1. – С. 24–29.

4. Bajzar L. Both cellular and soluble forms of thrombomodulin inhibit fibrinolysis by potentiating the activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor / Bajzar L. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 2792–8.
5. Ceriotti G. An improved method for the microdetermination of arginine by use of 8-hydroxyquinoline/ Ceriotti G., Spandrio L. // J. Biochem. – 1957. – Vol. 66. - P. 603–607.
6. Medved L. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin / Medved L., Nieuwenhuisen W.// Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 89. – P. 409-419.
7. Mengerink Y. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the *o*-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and *o*-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents: High-performance liquid chromatography-mass spectrometry study./ Mengerink Y. et al. // J. Chromatogr. A. - 2002. – Vol. 949. – P. 99–124.
8. Mosnier L.O. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis / Mosnier L.O., Bouma B.N. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2006. – Vol.26. – P. 2445-2453.
9. Willemse J.L. Measurement of procarboxypeptidase U (TAFI) in human plasma: a laboratory challenge / Willemse J.L., Hendriks D.F. // Clin. Chem. - 2006. – Vol.52. – P. 30–36.

В.В. Никитина, Е.Г. Маевская, А.А. Скоромец, Е.Р. Баранцевич
**КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ ПАЦИЕНТКИ С ДЕФЕКТОМ ГЕНА
МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТ РЕДУКТАЗЫ, СТРАДАЮЩЕЙ
ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНЬЮ, ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ**

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

katya-mayewskaya@mail.ru, 8-(812)-499-71-08

Резюме: Гипергомоцистеинемия способствует ускорению развития атеросклероза и формированию осложнений. Наблюдение пациентки, страдающей цереброваскулярной болезнью в форме гипергомоцистеинемии средней степени тяжести. Подтверждена необходимость мониторинга уровня общего гомоцистеина в плазме крови.

Ключевые слова: цереброваскулярная болезнь, общий гомоцистеин, гипергомоцистеинемия.

Abstract: Hyperhomocysteinemia promotes atherosclerosis and accelerates the development of its complications. The paper reports the following clinical case: a female patient with cerebrovascular disease associated with hyperhomocysteinemia of moderate severity. The relevancy of total homocysteine plasma level monitoring has been confirmed.

Key words: cerebrovascular disease, total homocysteine, hyperhomocysteinemia.

Распространенность гипергомоцистеинемии (ГГ) среди больных с симптомами атеросклеротического поражения артерий составляет 13-47 %.

В данной статье мы приводим результаты наблюдения пациентки среднего возраста, страдающей ГГ.

Пациентка М., 1953 года рождения работала бухгалтером, в настоящее время инвалид II группы. С декабря 2007 года по февраль 2008 года наблюдалась в Санкт-Петербургском Государственном медицинском университете им. акад. И.П.Павлова. 14 декабря 2007 года на момент осмотра предъявляла жалобы: на сужение полей зрения, слабость мышц конечностей, онемение правой половины тела.

Анамнез заболевания: в течение 10 последних лет страдает гипертонической болезнью, максимальное повышение артериального давления (АД) до 210/110 мм рт ст. (АД рабочее 130/80 мм рт ст.). В 1999 году перенесла острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) в

бассейне левой средней мозговой артерии по типу ишемии с умеренными речевыми нарушениями и легким центральным правосторонним гемипарезом. По данным магнитно-резонансной томографии головного мозга (МРТ ГМ) от 1999 года: лейкоарейоз в обоих полушариях головного мозга. Вечером 20.07.06 на фоне общего благополучия, когда отдыхала на даче, остро развилось нарушение речи, слабость правых конечностей, рвота. С 26.07.06 по 26.09.06 года лечилась в Мариинской больнице. Результаты МРТ ГМ от 29.09.06 года: картина внутримозговой хронической гематомы в области базальных структур слева (вероятно, ОНМК по геморрагическому типу в бассейне левой средней мозговой артерии) Множественные очаги изменений в веществе мозга постишемического характера. Лейкоарейоз. Смешанная заместительная гидроцефалия. «Пустое» турецкое седло. Получала терапию в виде поляризующего раствора, ПК-Мерц, дексон, эналаприл, верапамил, метопролол, энцефабол, депакин, акатинол. При выписке из стационара в неврологическом статусе регистрировалась следующая очаговая неврологическая симптоматика: выраженные когнитивные, зрительно-пространственные нарушения, псевдобульбарный паралич, глубокий центральный правосторонний гемипарез, правосторонняя гемигипестезия с нарушениями мышечно-суставного чувства до локтевых и голеностопных суставов, легкий амиостатический синдром.

Анамнез жизни: наследственность: отец страдал нарушениями сердечного ритма, перенес тромбоэмболию легочной артерии, у матери варикозная болезнь вен нижних конечностей.

Неврологический статус (декабрь 2007 г): когнитивные нарушения в виде нарушения памяти на текущие события. Краткая шкала оценки психического статуса (MMSE) – 26 баллов (De Paulo J.R., Folstein V.F., Gordon D., 1980). Преддементные когнитивные нарушения. Определяется снижение фона настроения: оценка по шкале Гамильтона 20 баллов

(Hamilton M., 1959). Правосторонняя гомонимная гемианопсия. Периферический парез мимической мускулатуры справа. Псевдобульбарный паралич. Центральный трипарез с преобладанием правостороннего центрального гемипареза. Снижение мышечной силы наиболее выражено в дельтовидной мышце, мышцах-разгибателях, приводящих пальцы правой кисти – 0 баллов, двуглавой мышце плеча – 1 балл, трехглавой мышце плеча – 2 балла. Мышечная сила в мышцах нижних конечностей снижена больше в правой нижней конечности: в большой ягодичной мышце справа - 4 балла, подвздошно-поясничной мышце справа до 3 баллов. Правосторонняя гемигипестезия на все виды чувствительности.

10.12.07 иммуноферментным методом исследовали уровень общего гомоцистеина (оГЦ) в плазме крови. Зарегистрировано значительное повышение этого показателя до уровня 35 мкмоль/л. Был выставлен диагноз ГГ средней степени тяжести. Назначено контрольное биохимическое исследование уровня ГЦ через 1 мес после проведения пероральной терапии витаминами В 6, В9, В 12. Проведено генотипирование метилентетрагидрофолат редуктазы (МТГФ), гена протромбина, V фактора Лейдена.

Результаты ультразвукового дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий (БЦА) от 27.12.07: ультразвуковые признаки атеросклероза. Стеноз в устье правой внутренней сонной артерии до 50-52 % по площади (46% - по периметру), в бифуркации правой общей сонной артерии до 40 %, в устье левой внутренней сонной артерии до 20 %. Вертеброгенные изменения кровотока в обеих позвоночных артериях.

Биохимические показатели плазмы крови от 13.02.08 были в пределах нормы. В частности, глюкоза 5,2 ммоль/л; оГЦ 8,5 мкмоль/л; общий холестерин 5,13 ммоль/л; липопротеиды высокой плотности 1,5 ммоль/л; липопротеиды очень низкой плотности 0,67; липопротеиды низкой

плотности 2,96 ммоль/л; триглицериды 1,47 ммоль/л. Коагулографические показатели в плазме крови также были в пределах нормы. Международное нормализованное отношение было в пределах 1,16, АЧТВ 39 с, протромбиновый индекс 85,37 %.

Результаты генотипирования МТГФР – генотип Т/Т. 20.02.08 в отделе биохимии научно-исследовательского центра проводились биохимические исследования уровней α -глутамилтранспептидазы и β -2-макроглобулина в плазме крови с помощью спектрофотометрических методик, уровень которых составил 62,8 U/л (норма=7-32 U/л), и 0,4 мкмоль/л (норма=0,36 \pm 0,02 мкмоль/л) соответственно.

21.02.08 при неврологическом исследовании отмечалась положительная динамика: улучшилась память на текущие события, восстановилась мышечная сила в мышцах конечностей. Мышечная сила в дельтовидной мышце справа – 1 балл, двуглавой мышце плеча – 2 балла.

После дообследования 20.02.08 пациентке было рекомендовано проведение повторных коагулографических исследований плазмы крови (1 раз в месяц), липидного спектра, глюкозы, АЛТ, АСТ, о ГЦ в плазме крови; дуплексное сканирование БЦА - через 6 месяцев. Пациентка постоянно получает варфарин, ингибиторы АПФ, β -блокаторы, мидокалм, витаминотерапию (препарат «Ангиовит»). На 6 мес назначены витамин Е, статины. Проведена беседа с пациенткой и родственником о необходимости соблюдения диеты с низким содержанием животных жиров.

Известно, что ГГ оказывает повреждающее воздействие на эндотелиальные клетки артерий [2-4]. Токсические эффекты ГГ проявляются также увеличением свертываемости крови и усилением атеросклеротических процессов вследствие чувствительности тромбоцитов, эндотелиальных и других клеток. Отмечено, что в клетках с повышенным уровнем активности α -глутамилтранспептидазы повышен

также уровень продуктов перекисного окисления липидов [1] . Это подтверждается и результатами исследований, проведенных в нашем наблюдении.

Список литературы:

1. Жлоба А.А., Никитина В.В. Выявление и лечение гипергомоцистеинемии.- Пособие для врачей. – М.: Дружба народов, 2004. – 40 с.
2. De Paulo J.R., Folstein V.F., Gordon D. Psychiatric screening on a neurological ward // Psychological Medicine.-1980.-№.10-P.125-132.
3. Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating // Br.J.Med.Psychol.- 1959.-Vol.32.-P.50-55.
4. Wechsler D. A standardized memory scale for clinical use // J.of Psychology.- 1945.-Vol.19.-P.87-95.

М.А. Кучер, О.В. Станевич, А.А. Ганапиев, Т.Ф. Субботина,
А.А. Жлоба, Б.В. Афанасьев

**АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПРОФИЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ – МЕТОД РАННЕЙ
ДИАГНОСТИКИ ИЗМЕНЕНИЙ НУТРИТИВНОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ
С ВЫСОКОДОЗНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИЕЙ И ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

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

Subbotina2002@mail.ru, 8-(812)-499-71-08

Резюме: Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) – является одним из наиболее современных и эффективных методов лечения, гематологических, аутоиммунных, генетических заболеваний и солидных опухолей.

Учитывая желудочно-кишечную токсичность и метаболические нарушения, возникающие при проведении режимов кондиционирования, проведение нутритивной поддержки (НП) в виде энтерального и/или парентерального питания является важной и неотъемлемой частью терапии пациентов с ТГСК.

Нерешенной на данный момент проблемой остается мониторинг НП, так как на данном этапе не существует патогномичного маркера для определения ее эффективности.

Целью настоящей работы стала апробация новой методики определения спектра аминокислот, отражающего метаболические процессы в клетке при ТГСК с помощью высоко эффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), нутритивная поддержка, аминокислотный профиль.

Abstract. Considering gastro-enteric toxicity and metabolic imbalance which arise during and after conditioning regimen, nutrition support (NS) - enteral and/or parenteral nutrition is an important and an integral part of therapy of patients with HSCT.

Unresolved problem at present is a monitoring of NS - now days there is no pathognomonic marker for definition of its efficiency.

New technique approbation - definition of a spectrum of the amino acids reflecting metabolic processes in cell during HSCT with the help of highly effective liquid chromatography became the purpose of the present work.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation, nutritional support, amino acid profile.

Введение. ТГСК - это современное и эффективное лечение, гематологических, аутоиммунных, генетических заболеваний и солидных

опухолей, основанное на проведении высокодозной химиолучевой терапии и последующей инфузии гемопоэтических стволовых клеток [1].

Однако результативность ТГСК в значительной мере снижается из-за развития тяжелых осложнений, некоторые из которых возникают во время режима кондиционирования (мукозит, веноокклюзионная болезнь печени) или в посттрансплантационном периоде (реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [2]. Вышеуказанные осложнения, наряду с инфекционными и метаболическими часто провоцируют развитие белково-энергетической недостаточности, дефицита и дисбаланса нутриентов, которые крайне необходимы для формирования процессов репарации тканей, иммунных функций, гемопоэза [3]. Эти изменения приводят к увеличению летальности, расходов на лечение и сроков госпитализации [4]. В связи с этим с конца 80-х годов прошлого столетия в протоколы терапии пациентов с ТГСК стало внедряться искусственное питание или нутритивная поддержка (НП) в виде энтерального и/или парентерального питания [5]. В настоящее время НП является неотъемлемой частью в терапии пациентов с ТГСК.

Нерешенной на данный момент проблемой остается мониторинг НП, так как на данном этапе не существует патогномичного маркера для определения ее эффективности и только оценка комплекса антропометрических и лабораторных показателей более или менее способна дать четкую картину проводимой терапии [6]. Оценка азотистого баланса затруднена в связи частым наличием рвоты и диареи. Считаемые относительно объективными быстро превращающиеся белки преальбумин и ретинол-связывающий белок могут рассматриваться как мониторы питательного статуса, однако следует учитывать их нестабильность при различных клинических состояниях (стресс, воспаление, повреждение печени и почек) [1]. Биохимические (общий

белок, альбумин, трансферрин) не дают представления о характере необходимой коррекции.

В настоящей работе проведена апробация усовершенствованной методики определения спектра аминокислот плазмы крови, отражающего метаболические процессы в клетке при ТГСК.

Аминокислотный профиль плазмы крови, исследуемый натощак, отличается большой индивидуальной стабильностью и не зависит существенно от особенностей недавно принятой пищи. Он 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 долговременный характер питания (в частности, белково-энергетическая адекватность, содержание витаминов и микроэлементов), степень усвоения питательных веществ в желудочно-кишечном тракте, а также нарушения метаболизма индивидуальных аминокислот. Исследования последних лет показывают, что изменения аминокислотного профиля при большом числе патологий весьма специфичны, поэтому данный анализ все более востребуется клинической практикой, как в целях диагностики, так и для назначения метаболической терапии [8].

Материалы и методы. 11 пациентов с острым миелобластным лейкозом (из них все взрослые, 10 – женщины, средний возраст 33,7 лет) были обследованы дважды: при поступлении в клинику Института детской гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой и после курса высокодозной полихимиотерапии/кондиционирования. У всех пациентов проводилась оценка нутритивного статуса с помощью антропометрических (индекс массы тела, окружность плеча, толщина кожно-жировой складки над трицепсом, окружность мышц плеча) и лабораторных показателей (общий белок, альбумин, глюкоза, мочевины). У троих больных

диагностирована ремиссия, а у остальных – прогрессия основного заболевания.

Плазму получали из венозной крови, взятой натощак и стабилизированной 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Все реактивы, использовавшиеся в хроматографическом анализе, имели квалификацию ос.ч. Анализ аминокислот проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по модифицированной методике Agilent [9]. В отличие от прототипа, депротеинизацию проводили сульфатом бария в щелочной среде с введением внутреннего стандарта - норвалина. ВЭЖХ-анализ проводили с использованием хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc, США, ФРГ, Япония) и обращенно-фазной колонки C18 Zorbax SB (4,6 x 250) мм, 3,5µм. Предколоночную дериватизацию орто-фталевым альдегидом осуществляли автоматически с использованием автосамплера. Разделение проводили при 40°C и скорости подачи элюента 0,8 мл/мин в градиенте ацетонитрила. УФ-детектирование осуществляли при длине волны 338 нм. В начале серии анализов проводилась калибровка стандартной смесью из 16 L-аминокислот (Fluka), рекомендуемой фирмой Agilent, дополненной аминокислотами, важными для клинической оценки данных: аспарагином, глутамином, цитруллином, орнитином и триптофаном (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия). Расчеты параметров разделения и определение концентраций аминокислот осуществлялись встроенным аппаратно-программным комплексом анализатора. Таким образом, усовершенствованный нами метод позволял идентифицировать 20 аминокислот.

Статистический анализ проводили с использованием методов непараметрической статистики в программе SPSS 16.0. Достоверность различий показателей пациентов в сравнении с референтными значениями, известными из литературы, оценивали с помощью критерия знаков.

Достоверность различий показателей в динамике оценивали с помощью теста Вилкоксона для парных наблюдений. Для оценки корреляционной зависимости рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение. Исходный аминокислотный профиль пациентов в сопоставлении с известными из литературы референтными значениями [10, 11] характеризовался выраженным дисбалансом (рис.1).



Рис. 1. Аминокислоты плазмы крови пациентов с острым миелобластным лейкозом

Отмечено достоверное и существенное снижение концентраций большинства аминокислот, за исключением глутамата и триптофана, концентрации которых были достоверно выше в сравнении с показателями здоровых лиц. Выявленные закономерности согласуются с известными из литературы единичными наблюдениями [12]. В плазме крови

обследованных в сочетании с дефицитом валина, лейцина, изолейцина, т.е. аминокислот с разветвленной цепью (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 гипокалорическую белковую недостаточность [13]. Следует отметить, что понижение уровня треонина отмечается в той или иной степени у всех пациентов. Эта незаменимая аминокислота, обычно содержащаяся в пище в достаточном количестве, всасывается в желудочно-кишечном тракте медленнее других аминокислот, поэтому ее уровень позволяет судить о выраженности мальабсорбции [8].

После курса полихимиотерапии/кондиционирования отмечено достоверное ухудшение антропометрических показателей, снижение общего белка и альбумина ($p<0,01$). По данным аминокислотного анализа отмечается появление многочисленных достоверных корреляций глутамина, аргинина, цитруллина, аланина и некоторых других аминокислот между собой и с уровнем мочевины. В сочетании с возросшим уровнем глутамина и аланина это свидетельствует об активизации катаболизма аминокислот. Отмечается также дальнейшее существенное понижение концентрации аргинина, в умеренной степени - глицина, треонина и ряда других незаменимых аминокислот, что указывает на усугубление белковой недостаточности пациентов, хотя эта тенденция

по большинству показателей не достигает статистической значимости. Достоверно более чем двукратное понижение концентрации метионина ($47,9 \pm 16,5$ мкМ – исходный уровень; $21,4 \pm 11,6$ мкМ – после кондиционирования; $p < 0,01$; референтный интервал 26-49 мкМ). Эта динамика может объясняться нарушением процесса регенерации метионина путем реметилирования вследствие развившегося на фоне полихимиотерапии дефицита витамина В₁₂ и/или фолиевой кислоты.

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

Ранняя диагностика катаболизма позволит превентивно корректировать дефицит тех или иных нутриентов, тем самым способствуя оптимизации процессов репарации, регенерации, более эффективной работе антиоксидатной системы, моделированию воспалительного ответа, часто приводящего к кахексии и пациентов с онкопатологией.

Список литературы:

1. Muscaritoli M., Gricco G., Capria S., et al. Nutritional and metabolic support on patients undergoing bone marrow transplantation: Review article. American Journal of Clinical Nutrition (Bethesda MD). – 2002. – Vol. 75. - N2. – P.183-190.
2. Lipkin A.C., Lenssen P., Dickson B.S. Nutrition issues in hematopoietic stem cell transplantation: state of the art. Nutrition in clinical practice 2005; 20(4):423-439.
3. Papadopoulou A., MacDonald A., Williams M.D., et al. Enteral nutrition after bone marrow transplantation. Archives of disease in childhood 1997; 77(2):131-136.
4. Arends J., Zuercher G., Dossett A., et al. Non-surgical oncology – Guidelines on Parenteral Nutrition. German Medical Science 2009; 7:1-14.

5. Weisdorf S.A., Lysne J., Wind D., et al. Positive effect of prophylactic total parenteral nutrition on long-term outcome of bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987; 43:833-838.
6. Aggett P.J.A. Trace elements in human health. *Practitioner*. – 1984. – Vol. 228. – P. 935-8.
7. Ringwald-Smith K.A. et al. Transplantation in children. Energy expenditure in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation (Basingstoke)*. – 2002. – Vol. 30. - №2. – P.125-130.
8. Kimura T, Noguchi Y, Shikata N, Takahashi M. Plasma amino acid analysis for diagnosis and amino acid-based metabolic networks // *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. – 2009. – N12. – P.49-53.
9. Gratzfeld-Huesgen A. Sensitive and reliable amino acid analysis in protein hydrolysates using the HP 1100 Series HPLC. – *Agilent Technical Note*. – 1998.
10. Клиническая оценка лабораторных тестов / Под ред. Н.У. Тица: Пер. с нем. – М.: Медицина, 1986. – 480 с.
11. Gitlitz P.H., Sunderman F.W. J., Hohnadel D.C. Ion-exchange chromatography of amino acids in sweat collected from healthy subjects during sauna bathing // *Clin. Chem.* – 1974. – V.20, N10. – P.1305-1312.
12. Muscaritoli M., Conversano L., Petti M.C. et al. Plasma amino acid concentrations in patients with acute myelogenous leukemia // *Nutrition*. – 1999. – V.15, N 3. – P.195-199
13. Małgorzewicz S., Debska-Slizień A., Rutkowski B. et al. Serum concentration of amino acids versus nutritional status in hemodialysis patients // *J. Ren. Nutr.* -2008. V.18, N 2. – P.239-47.
14. Amino acid plasma profile - a method of early diagnostics of changes in nutrition status in patients with high dose chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation // *The Record of the I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University*. – 2010. - V.17, N4. – P.20-22.

ГТ ГАЛА - ТРЕЙД
WWW.GALATRADE.RU



Химические реактивы
Стандартные образцы
Все для хроматографии
Аналитические приборы
Лабораторное оборудование

193231, г. Санкт-Петербург,
ул. Латышских Стрелков д. 31 оф. 501А
Тел./Факс: (812) 448-91-09
E-mail: info@galatrade.ru



www.galatrade.ru

REDA

REDA

REDA

REDA

REDA

REDA



Научное издание

Всероссийская IV-я научная конференция
**«Аналитика как инструмент
клинической химии»**

Санкт-Петербург, 25-26 апреля 2012 года

Бюллетень

Отдел биохимии НИЦ СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8, корп. 3
тел.: 8(812) 499-71-08
E-mail: alizlex@mail.ru
