



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



**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
3-й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ
ХИМИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ»,
ПОСВЯЩЕННОЙ
110-ЛЕТИЮ ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК,
ПРОФЕССОРА А. П. БРЕСТКИНА**

1–2 декабря 2022

Часть 1



Санкт-Петербург
2022

Министерство здравоохранения Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России)

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
3-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ХИМИКО-
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ»,
ПОСВЯЩЕННОЙ 110-ЛЕТИЮ
ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК,
ПРОФЕССОРА А. П. БРЕСТКИНА**

**Санкт-Петербург
1–2 декабря 2022 года**

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

Часть 1

**Санкт-Петербург
2022**

УДК 54+57+61
ББК 24.28.5
С56

Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов 3-й Международной конференции, посвященной 110-летию доктора биологических наук, профессора А.П. Бресткина. 1–2 декабря 2022 года / под ред. Л.Б. Гайковой, Н.В. Бакулиной. Ч. 1. — СПб.: Изд-во ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, 2022. — 352 с.

ISBN 978-5-89588-413-3

Ч. 1 978-5-89588-414-0

Редакционная коллегия: д.м.н., заведующая кафедрой биологической и общей химии им. В.В. Соколовского доцент *Гайковая Л.Б.*; д.х.н., профессор *Дадали В.А.*; к.п.н., доцент *Иванова И.С.*; к.х.н., доцент *Попов А.С.*; к.х.н., доцент *Чухно А.С.*

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

Материалы публикуются в авторской редакции.

Проблемное поле конференции:

- Актуальные вопросы физической, коллоидной, аналитической, органической и неорганической химии природных и биологически активных соединений, а также применение химии в медицинской практике.
- Актуальные вопросы биологической и медицинской химии.
- Инновационные технологии в клинической лабораторной диагностике.
- Современные достижения в доклинических и клинических исследованиях.
- Проблемы теории и практики химико-биологического образования в медицинском вузе.

© ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

АЛЕКСАНДР ПАВЛОВИЧ БРЕСТКИН — ЧЕЛОВЕК, УЧЕНЫЙ И ПЕДАГОГ (к 110-летию со дня рождения)	11
<i>Попов А.С., Гайковая Л.Б.</i>	

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ХИМИИ ПРИРОДНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, А ТАКЖЕ ПРИМЕНЕНИЕ ХИМИИ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ	20
---	-----------

Беляев А.П., Антипов В.В.

ПЬЕЗОКВАРЦЕВОЕ МИКРОВЗВЕШИВАНИЕ ПАРОВ В АТМОСФЕРЕ	20
---	----

Васильева Н.Г., Козлова-Козыревская А.Л., Огейко Н.Г.

К ВОПРОСУ СИНТЕЗА ДЖЕНЕРИКОВ	27
------------------------------------	----

Гулєнова М.В., Пискунова М.С., Жданович И.В., Пиманова Н.А.

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ ОКИСЛЕНИЕ 3,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-О-БЕНЗОХИНОНА И 3,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛПИРОКАТЕХИНА ТРЕТ-БУТИЛГИДРОПЕРОКСИДОМ В ПРИСУТСТВИИ ТРЕТ-БУТОКСИДОВ АЛЮМИНИЯ, ТИТАНА И ЦИРКОНИЯ	29
--	----

Дадали В.А., Соколова Е.А., Степанова Н.П.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АПОКАРОТИНОИДОВ <i>CROCUS SATIVUS</i> L.-ПРОТЕКТОРОВ ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ	34
---	----

Дребенкова И.В., Кузовкова А.А.

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В МОДЕЛЬНЫХ СРЕДАХ, ИМИТИРУЮЩИХ ПИЩЕВУЮ ПРОДУКЦИЮ, КОНТАКТИРУЮЩУЮ С УПАКОВКОЙ	42
--	----

Елисеев С.Ю.

ГИПЕРВАЛЕНТНОСТЬ — СТРОЕНИЕ ДИОКСИДА АЗОТА	47
--	----

Ермишина Е.Ю.

ДИФФУЗИЯ ИОНОВ НАТРИЯ ЧЕРЕЗ ПОЛУПРОНИЦАЕМУЮ МЕМБРАНУ НА ПРИМЕРЕ РАСТВОРОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОГО БАЛАНСА	54
--	----

<i>Ермишина Е.Ю., Еловицова Т.М.</i> ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ СРЕДСТВ ГИГИЕНЫ.....	58
<i>Ермишина Е.Ю., Наронова Н.А.</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ КАЛИЯ И НАТРИЯ В МОЛОЧНЫХ СМЕСЯХ, ПРИГОТОВЛЕННЫХ НА РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ВОД.....	61
<i>Жилинская Н.Т., Бландов А.Н., Жарков О.В., Муста оглы Н.М.</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ СЫЧУЖНОГО ФЕРМЕНТА МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КОЗЬЕМ И КОРОВЬЕМ МОЛОКЕ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЖИРНОСТИ	65
<i>Катаева Н.Н., Шукина А.А., Шукина Я.А., Чернецова А.Д., Панкратова А.Д., Белоконова Н.А.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ АНТИБИОТИКА ДИОКСИДИНА	71
<i>Ковалев Г.С., Голицына К.О.</i> ИЗУЧЕНИЕ АДсорбЦИИ И ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТВОРОВ АСКОРБАТА И ГЛИЦИНАТА МЕДИ (II).....	77
<i>Кокорина М.Л., Есаулкова А.Н., Жиялков А.А., Катаева Н.Н., Белоконова Н.А.</i> ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ЦЕФТРИАКСОНА К АДсорбЦИИ И КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЮ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	82
<i>Корнишева А.В., Катаева Н.Н., Белоконова Н.А.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ЦИКЛОФЕРОНА.....	88
<i>Краецкая О.Ф.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ <i>IN SILICO</i> ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПРОТИВОАНГИОГЕНЕЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНИЗИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИОГЛИТАЗОНА.....	94
<i>Кременевская М.И., Шерстнев В.В., Чухно А.С., Романенко М.С., Тухватуллина Е.Р., Рудометова М.О., Сучкова К.М.</i> ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВО-ПОРИСТЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ НА ОСНОВЕ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА ОСНОВЕ МЕХАНИЗМА ТЕПЛОВОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ.....	102

<i>Курскова А.О., Кривоколыско С.Г.</i> ИЗУЧЕНИЕ АМИНОМЕТИЛИРОВАНИЯ 5-АМИНО-3- (ЦИАНОМЕТИЛ)-1Н-ПИРАЗОЛ-4-КАРБОНИТРИЛА	109
<i>Кустова Т.П., Кочетова Л.Б.</i> ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГЛИЦИН- <i>L</i> -ЛЕЙЦИНА И ПРОДУКТА ЕГО БЕНЗОИЛИРОВАНИЯ	112
<i>Лахвич Ф.Ф., Ринейская О.Н.</i> ИЗУЧЕНИЕ АФФИННОСТИ РИВАРОКСОБАНА <i>IN SILICO</i> К β-КЕТОАЦИЛ[АСР]СИНТАЗЕ 1	118
<i>Лисовский Д.С., Дударев В.Г.</i> ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ДИАЛКИЛАМИНОЭТИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХЛОРЗАМЕЩЕННОГО САЛИЦИЛАНИЛИДА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВОГЕЛЬМИНТНЫЕ СУБСТАНЦИИ	125
<i>Наронова Н.А., Рюмина А.А., Семенова П.В.</i> ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ МОДЕЛЬНОЙ КДС НА ОСНОВЕ ФОСФАТА КАЛЬЦИЯ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ	135
<i>Нечаева Е.А., Повыдыши М.Н., Кириллова Н.В., Спасенкова О.М., Ильченко А.С.</i> ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ШАЛФЕЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО (<i>SALVIA OFFICINALIS L.</i>) В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	141
<i>Подюков Е.И., Голицына К.О.</i> ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ШИПУЧИХ ТАБЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ЦИТРАТ ЦИНКА, НА МОДЕЛЬ ЗУБНОЙ ЭМАЛИ	146
<i>Радин М.А., Широкова И.Ю., Чухно А.С., Штольман Е.А., Гафаров М.Б., Каленик Д.Д.</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В СУХИХ ОБРАЗЦАХ КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТОДОМ АТОМНО- ЭМИССИОННОГО СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА	151
<i>Сибирцев В.С., Радин М.А., Мамина А.А.</i> МЕТОДИКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ К СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ	160

<i>Слободов А.А., Радин М.А., Ворожцова Ю.С., Ефимов Р.Д., Мелентьев А.В., Иванова А.Н.</i>	
ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ РАСЧЕТА ХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ В УСЛОВИЯХ СИНТЕЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ	168
<i>Труханова Ю.А., Алексеева Г.М., Куваева Е.В.</i>	
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОГО АНАЛЬГЕЗИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА	179
<i>Труханова Ю.А., Куваева Е.В., Яковлев И.П.</i>	
СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИФЕНИЛГУАНИДИНА, ОБЛАДАЮЩИХ ВЫСОКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ БИОАКТИВНОСТИ	183
<i>Фадеева В.И., Рябухин Д.С., Политанская Л.В., Романов В.Е., Трошкова Н.М., Васильев А.В.</i>	
СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ФТОРИРОВАННЫХ 2-ГИДРОКСИМЕТИЛБЕНЗИМИДАЗОЛОВ С БЕНЗОЛОМ В CF_3SO_3H	186
<i>Фандо Г.П.</i>	
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ АНДРОСТАНА	189
<i>Феоктистова В.А., Немеш М.В., Новикова Т.А., Плеханов А.Ю., Пузык М.В.</i>	
СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСОВ $Pd(II)$ С ДНК	194
<i>Чеботкова Д.В., Крымская Т.П., Лебединская К.С., Капелько И.М.</i>	
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМЛОДИПИНА БЕСИЛАТА, ПРОИЗВОДНОГО 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНА, СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ.....	201
<i>Широкова И.Ю., Кучук В.И., Радин М.А., Демина Е.В., Коледенко Д.В., Малков С.Д., Зарифи К.О.</i>	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ПОЛЯРИМЕТРИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ИБУПРОФЕНА.....	207

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ.....	213
<i>Али Адиб Хуссейн Али</i>	
ДИСЛИПИДЕМИЯ ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ ВЕСЕ.....	213
<i>Бахтюков А.А., Деркач К.В., Лебедев И.А., Шпаков А.О.</i>	
АНОРЕКСИГЕННЫЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ФРАГМЕНТА ЛЕПТИНА ПРИ КУРСОВОМ ЛЕЧЕНИИ КРЫС С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ ОЖИРЕНИЕМ	217
<i>Бахтюков А.А., Деркач К.В., Сорокоунов В.Н., Лебедев И.А., Фокина Е.А., Шпаков А.О.</i>	
СТЕРОИДОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ГОНАДОТРОПИНА И НИЗКОМОЛЕКУЛЯР-НОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА У САМЦОВ КРЫС С ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА.....	224
<i>Винников И.С., Вольхина И.В.</i>	
NGF В ОНКОЛОГИИ.....	229
<i>Вохмянина Н.В., Гайковая Л.Б., Павлова Р.Н., Асятрян Т.Т., Бутхузи Д.Ш.</i>	
АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СУБСТАНЦИИ Р НА ГОМЕОСТАЗ КОСТНОЙ ТКАНИ	233
<i>Гаврилова С.О.</i>	
ОСОБЕННОСТИ УРОВНЕЙ ТЕСТОСТЕРОНА И КОРТИЗОЛА ГРЕБЦОВ-АКАДЕМИСТОВ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ УСПЕШНОСТИ СОРЕВНОВАТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ	241
<i>Гайковая Л.Б., Евтеева Д.А., Вохмянина Н.В.</i>	
ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА MTHFR677СТ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ГОМОЦИСТЕИНА, ВИТАМИНА В ₁₂ И ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ И ИСХОД У ПАЦИЕНТОВ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ.....	246

<i>Голованова Н.Э., Басанько А.В., Астратенкова И.В., Лукьянова И.Ю.</i> АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ	255
<i>Дадали В.А., Лейбиман Хаим</i> МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ: ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА	260
<i>Дмитриева М.Е., Шелковникова В.Н., Бельишенко А.Ю., Мальгина Е.В., Моргунова М.М., Власова А.А., Имидоева Н.А., Тельнова Т.Ю., Аксенов-Грибанов Д.В.</i> ОЦЕНКА СИНТЕЗА АНТИОКСИДАНТОВ И НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ ОКСИФИЛЬНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ОЗЕРА БАЙКАЛ	271
<i>Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В., Байгильдин С.С., Хуснутдинова Н.Ю.</i> ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ХЛОРИДА КАДМИЯ НА ДНК ГЕПАТОЦИТОВ МЫШИ	276
<i>Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Зиатдинова М.М., Якупова Т.Г., Ахмадеев А.Р., Ретина Э.Ф.</i> КЛЮЧЕВЫЕ ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ АЛЮМИНИЯ У ЖИВОТНЫХ	279
<i>Лебедева Е.И., Бабенко А.С., Щастный А.Т.</i> ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У КРЫС WISTAR ИНДУЦИРОВАННОГО ТИОАЦЕТАМИДОМ	282
<i>Лопарева Д.Д., Чайка Н.А.</i> СТАРЕНИЕ КОЖИ И МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ	289
<i>Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В., Гизатуллина А.А., Каримов Д.О., Кудояров Р.Э., Кабирова Э.Ф.</i> ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОСЛОЖНЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ	295
<i>Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В., Каримов Д.О., Кудояров Э.Р., Тимашева Г.В., Хуснутдинова Н.Ю.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА КАСПАЗЫ-7 У КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АЛКОГОЛЯ	298

<i>Попова О.В., Иванова Е.Е.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО И ПРООКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ КОНЬЮГАТОВ ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА С ТЕТРАФЕНИЛФОСФОНИЕМ.....	302
<i>Саврей А.М., Жерегеля С.Н.</i> РОЛЬ РНК-ДЕМЕТИЛАЗЫ ALKBH5 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	308
<i>Соловьева М.А., Бердичевский Г.М., Васина Л.В., Галкин М.А.</i> ВЛИЯНИЕ ЯДА ЦИТОМОРДНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (<i>AGKISTRODON HALYS</i>) НА СВЕРТЫВАЮЩУЮ СИСТЕМУ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	312
<i>Спасенкова О.М., Ли А.О., Кириллова Н.В., Нечаева Е.А.</i> ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА МАЛОБЕНА НА ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ	317
<i>Сухопаров П.Д., Вольхина И.В.</i> ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА.....	323
<i>Сяхович В.Э., Рута-Жуковская Е.Я., Лобода К.А., Бабарико Д.В., Бакакина Ю.С., Походня Ю.Г.</i> ПОЛУЧЕНИЕ И ТАНДЕМНЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ ГЛАВНОЙ И МИНОРНОЙ ИЗОФОРМ ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА	329
<i>Фокина Е.А., Деркач К.В., Сорокоумов В.Н., Бахтюков А.А., Морина И.Ю., Шпаков А.О.</i> СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ РАЗЛИЧНЫХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА ОВАРИАЛЬНЫЙ СТЕРОИДОГЕНЕЗ У НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМОК КРЫС	337
<i>Чигасова А.К., Островская Л.А., Корман Д.Б.</i> ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО И ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАКРИЛАТА ЗОЛОТА	344

Уважаемые коллеги!

Вы открыли сборник научных трудов 3-й Международной конференции «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине», посвященной 110-летию со дня рождения доктора биологических наук, профессора А.П. Бресткина.

Научно-практическая конференция, организованная кафедрой биологической и общей химии им. В.В. Соколовского Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова проводится уже третий год. В этом году конференция посвящена 110-летию со дня рождения Александра Павловича Бресткина, который заведовал кафедрой химии в Ленинградском санитарно-гигиеническом медицинском институте с 1953 по 1963 г. Александр Павлович Бресткин (1912–1993) — доктор биологических наук, профессор, известный ученый в области химии, биологии, лауреат Сталинской и Государственной премии, заслуженный деятель науки России. Его научная деятельность связана как с физиологическими, так и с химическими аспектами морской медицины.

Традиционно сборник состоит из разделов по актуальным вопросам биологической и медицинской химии, клинической лабораторной диагностики, а также проблемам и новым методам преподавания в медицинском вузе.

Особенностью конференции и сборника 2022 года является представление научных статей по современным достижениям в доклинических исследованиях, представленных в основном группой авторов НПО «Дом фармации» (директор Макарова Марина Николаевна, доктор медицинских наук, научный руководитель Макаров Валерий Геннадьевич) и другими исследователями.

Надеюсь, что вопросы, обсуждаемые на конференции и материалы, представленные в сборнике, принесут новые знания как для студентов, обучающихся в медицинском вузе, так и для аспирантов, молодых ученых, научных сотрудников, преподавателей химико-биологических направлений и специалистов в различных областях знаний.

Желаю с пользой и приятно провести время при прочтении статей из сборника научных трудов!

*С уважением,
д-р мед. наук, заведующий кафедрой биологической
и общей химии им. В.В. Соколовского,
Гайковская Лариса Борисовна*

УДК 54; 577.15; 575

**АЛЕКСАНДР ПАВЛОВИЧ БРЕСТКИН — ЧЕЛОВЕК, УЧЕНЫЙ
И ПЕДАГОГ (К 110-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)**

Попов А.С.¹, Гайковая Л.Б.²

*ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России,*

Санкт-Петербург, Россия

Aleksei.Popov@szgmu.ru¹

Larisa.Gaikovaya@szgmu.ru²

Биография А.П. Бресткина, выдающегося химика, биохимика и энзимолога приведена. Указаны наиболее значительные научные достижения и публикации. Процитированы воспоминания коллег и учеников. Описаны результаты работы в должности заведующего кафедрой неорганической химии ЛСГМИ.

***Ключевые слова:** Бресткин Александр Павлович, 110-летие со дня рождения.*

**ALEXANDER PAVLOVICH BRESTKIN A MAN, SCIENTIST AND
TEACHER (ON THE 110TH ANNIVERSARY OF HIS BIRTH)**

Popov A.S.¹, Gaikovaya L.B.²

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov

Ministry of Health of the Russian Federation,

St. Petersburg, Russia

The biography of A.P. Brestkin, an outstanding chemist, biochemist and enzymologist is given. The most significant scientific achievements and publications are indicated. Recollections of colleagues and students are quoted. The results of work as the head of the Department of Inorganic Chemistry of LSGMI are described.

***Keywords:** Brestkin Alexander Pavlovich, 110th anniversary of his birth.*

Бресткин Александр Павлович (1912–1993) — известный химик, биолог, лауреат Сталинской премии II степени (1952), доктор биологических наук (1953), профессор (1954), лауреат Государственной премии (1979), заслуженный деятель науки России [1].



Александр Павлович Бресткин родился 17 августа 1912 года в семье управляющего имением в селе Махровка Борисоглебского района Воронежской области. Он был самым младшим из пяти братьев. Отец умер, когда мальчику было всего 12 лет, поэтому его воспитывал старший брат Михаил Александрович, в будущем генерал-майор медицинской службы, начальник кафедры физиологии военного труда в ВМА им. С.М. Кирова. Стоит отметить, что каждый из пяти братьев Бресткиных состоялся в своих областях как крупный специалист. Иван

Павлович был руководителем крупнейшего машиностроительного завода «Ревтруд» (г. Тамбов), Владимир Павлович — полковник медицинской службы, был заместителем генерал-лейтенанта, академика В.И. Воячека по клинике отоларингологии ВМА, Дмитрий Павлович, инженер-полковник, стал одним из крупнейших специалистов в минном деле.



А.П. Бресткин окончил среднюю школу в 1931 г. и начал трудовую деятельность слесарем-механиком на заводе «Электроприбор». Одновременно учился на химическом факультете Ленинградского государственного университета, который окончил в 1937 г. Научной работой начал заниматься еще студентом в Государственном институте высоких давлений под руководством академика В.Н. Ипатьева.

Бресткин проводил исследования нефтепродуктов с целью получения высокооктановых бензинов, итогом которых стала диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук «Исследование бинарных смесей газ-жидкость при высоких температурах и давлении», защита состоялась после войны, в 1947 г. [2, 3].

В 1941–1945 гг. А.П. Бресткин служил в Красной Армии в должности начальника химической службы полка (воинское звание — инженер-майор), награжден медалью «За боевые заслуги» и медалью «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.». В марте 1944 г. был направлен в Ленинградское дважды Краснознаменное пехотное училище, где преподавал химическое дело.

После Великой Отечественной войны, в декабре 1945 г., начал работу старшим научным сотрудником в Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, в баролаборатории, которая в дальнейшем была преобразована в кафедру физиологии военного труда. Область научных исследований в тот период — изучение процессов декомпенсации и рекомпенсации человеческого организма индифферентными газами, такими как азот и гелий, которые проводились под руководством академика Л.А. Орбели. Практической целью исследований являлось создание газовых смесей, наиболее пригодных для выполнения специфических профессиональных задач водолазами, а также разработка режимов глубоководных погружений [4, 5].

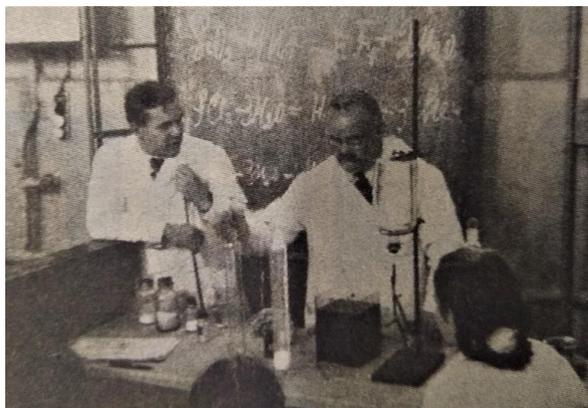
Работы проходили как в лабораторных условиях, так и длительных командировках на Дальний Восток и Черное море. Одновременно А.П. Бресткин был заместителем Орбели в Комиссии по глубоководным исследованиям при Президиуме АН СССР. Кроме научной работы, он занимался и педагогической деятельностью, преподавая теорию и практику газового анализа офицерам факультета повышения квалификации. В 1952 г. А.П. Бресткин был удостоен Сталинской премии II степени за исследования газообмена и его нарушений при глубоководных погружениях, кинетики образования пузырьков газов в тканях, которые имели существенное значение для профилактики кессонной болезни. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук «Опыт теоретического и экспериментального исследования механизма возникновения кессонной болезни» была защищена в 1953 г.

Практически одновременно с окончанием экспериментальной части докторской диссертации, ученый приступил к изучению кинетики ферментативных реакций, в частности началось исследование разложения перекиси водорода каталазой. По воспоминаниям Л.А. Ивановой [6], аспиранта Александра Павловича, любая работа для него была по плечу.

Он не только обладал фундаментальными познаниями в химии, был способен разобраться в математическом описании кинетики ферментов, но в условиях острой нехватки оборудования в послевоенные годы, мог собрать самодельный рН-метр, на газовой горелке выдуть необходимый сосуд.



Профессор А.П. Бресткин, доцент Е.Г. Прокофьева и ассистент Г.И. Линин. Кафедра неорганической химии ЛСГМИ. 1954 г.



*Профессор А.П. Бресткин и ассистент Г.И. Линин
Занятия в лаборатории ЛСГМИ. 1958 г.*

По рекомендации Л.А. Орбели Александр Павлович был избран на должность заведующего кафедрой неорганической химии Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института в июне 1953 г.

Десять лет, в течение которых Александр Павлович был заведующим кафедрой, были одним из самых насыщенных и результативных периодов в ее существовании. С учетом медицинских целей и задач учебный процесс был кардинально перестроен. Вступив в должность заведующего кафедрой, Бресткин тщательно проанализировал весь курс лекций и практических занятий, изменил его структуру и составил новую программу преподавания химии в медицинском вузе. Министерство здравоохранения утвердило эту рабочую программу дисциплины и рекомендовало в качестве базовой для различных медицинских специальностей. По воспоминаниям студентов того периода, лекции стали сопровождаться демонстрационными экспериментами. На практических занятиях был внедрен новый лабораторный практикум с использованием микроанализа. В те годы были изданы три учебно-методических пособия: качественный анализ, теоретические основы и количественный анализ, пособие по физической химии (1960) [6]. Также издано учебное пособие по неорганической и аналитической химии в трех частях. А.П. Бресткин внес существенный вклад в преподавание коллоидной химии, был введен раздел «аэрозоли», в 1974 г. по этой теме была написана статья для Большой медицинской энциклопедии.

Началась научная работа сотрудников по общей теме «Кинетика ферментативных реакций». Были изучены реакции, катализируемые ферментами каталазой, ложной холинэстеразой, щелочной фосфатазой и кислой фосфатазой. Четыре исследования были оформлены в качестве кандидатских диссертаций на соискание ученой степени кандидата химических наук, в том числе преподавателями кафедры Н.И. Ржехиной и Ю.Г. Жуковским. Уровень проводимых исследований был настолько высок, что более 60 заявок на методики исследований и отгиски статей, опубликованных в советской печати, поступило из различных иностранных лабораторий, в том числе из США. Н.И. Ржехина сделала доклад по результатам исследований щелочной фосфатазы на Ученом совете при АН СССР в 1963 г., Л.А. Иванова была приглашена выступить с пленарным докладом, посвященным вопросу инактивации холинэстеразы лошадиной сыворотки на Первом Всесоюзном биохимическом съезде в 1964 г.

Научные публикации ученого в период заведования кафедрой ЛСГМИ многочисленны и разнообразны [7]: «Оценка различных способов применения кислорода при декомпенсации водолазов» (1959), «О диффузии азота через кожные покровы человека во время дыхания кислородом» (1959), «Об изменениях высшей нервной деятельности человека при развитии кессонных явлений на высоте» (1958), «К вопросу о влиянии пониженного парциального давления кислорода на организм и о механизмах

уравновешивания последним этого влияния» (1958), «Влияние повышенной гидратации и окружающей температуры на возникновение и интенсивность кессонных явлений на высоте» (1958), «О пересыщенных растворах газов в жидкостях и о их значении в этиологии и профилактике кессонной болезни» (1958), «Активность препарата каталазы в атмосфере углекислого газа» (1955), «О декомпрессионном заболевании и его латентном периоде» (1950). В 1963 г. ученый перешел на работу в Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова АН СССР (ИЭФБ РАН), в котором до конца жизни был заведующим Лабораторией химии биологически активных веществ и Отделом эволюции медиаторных систем.



Профессор А.П. Бресткин в лаборатории ИЭФБ РАН 1984 г.

Стартовав с изучения фосфатаз, ученый стал крупнейшим специалистом в области энзимологии. Стоит отметить работы по дифосфорным эфирам, выполненные совместно с химиком-синтетиком М.С. Динабургом [8]. Содружество с химиками-фосфорорганиками под руководством академика М.И. Кабачника позволило получить большую группу высокоспецифичных субстратов холинэстераз [9]. Практически три десятилетия были посвящены изучению ступенчатого механизма холинэстеразного катализа. основополагающая работа 1965 г. [10], описывающая механизм холинэстеразного катализа, вошла практически во все современные монографии по холинэстеразам. Исследованы различные проблемы субстратной специфичности, механизмов обратимого и необратимого торможения ферментативной активности [11].

А.П. Бресткиным была разработана многоступенчатая кинетика торможения ферментативного катализа под влиянием высоких концентраций субстрата [12]. Ему принадлежит приоритет в установлении механизма активирующего эффекта ацетилхолина и других аммониевых ионов на реакцию холинэстеразного гидролиза [13].

Необходимо отметить работы [14, 15] по непродуктивному связыванию субстрата в активном центре холинэстераз, в которых были определены количественные параметры непродуктивной сорбции. Под руководством А.П. Бресткина разработан аналитический метод более точного расчета максимальной скорости и константы Михаэлиса [11].

Значительными являются также работы по сравнительной энзимологии холинэстераз ряда животных, находящихся на разных уровнях эволюционного развития [16]. Труды А.П. Бресткина по получению и исследованию свойств новых ферментативных препаратов были удостоены Государственной премии СССР.



*Мемориальная доска на здании кафедры химии
СПбГМА им. И.И. Мечникова 2007 г.*

Научное наследие Александра Павловича составляют 176 печатных работ и 2 монографии. Он является правообладателем 43 патентов на изобретение. Под его руководством было защищено 4 докторские и 26 кандидатских диссертаций. Высшей точкой научного наследия ученого и педагога стала написанная А.П. Бресткиным и дополненная учениками уже после его кончины монография «Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов» [11], в которой подведены итоги почти сорокалетних исследований.

Скончался Александр Павлович в июле 1993 года, похоронен на Богословском кладбище Санкт-Петербурга.

Список литературы

1. Розенгарт Е.В. Химия высоких давлений, барофизическая химия, сравнительная энзимология холинэстераз (к столетию со дня рождения Бресткина А.П.). // Ж. эволюционной биохимии и физиологии. 2012. Т. 48. С. 317–322.

2. Бресткин А.П., Рысаков М.В. Критические температура и давление нефтепродуктов и их смесей с газами // Химия твердого топлива. 1937. Т. 8. С. 1035–1044.

3. Ипатьев В.В., Бресткин А.П. Равновесие между жидкой и паровой фазами в системе водород-бензол при 3000 атм. // Ж. физ. химии. 1948. Т. 22. С. 765–777.

4. Бресткин А.П. О декомпрессионном заболевании и его латентном периоде // Военно-медицинский журнал. 1950. № 1. С. 10–19.

5. Бресткин А.П., Граменицкий П.М. Влияние повышенного и пониженного барометрического давления на температуру тела человека и тепловых // Военно-медицинский журнал. 1954. № 2. С. 74–83.

6. Иванова Л.А. Александр Павлович Бресткин — человек и ученый // Газета СПб государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова «Vivat Academia» № 57 от 27.08.2002.

7. Шабров А.В., Романюк В.П. Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова. К 100-летию со дня основания. Часть 2 (1945–2007). СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2008. С. 468–469.

8. Бресткин А.П., Новикова Н.П., Прокофьева Е.Г., Ржехина Н.И., Динабург М.С. О кинетике гидролиза фенолфосфата натрия и фенофталеиндифосфата под действием щелочной фосфатазы // Биохимия. 1961. Т. 26. С. 266–275.

9. Бресткин А.П., Касымов А.К., Майзель Е.Б., Розенгарт Е.В., Гмиров В.Е., Позднякова Л.Н., Хромов-Борисов Н.В. О специфичности тио-субстратов холинэстераз // Доклад АН СССР. 1976. Т. 29. С. 207–209.

10. Brestkin A.P., Rozengart E.V. Cholinesterase catalysis // *Nature*. 1965. Vol. 205. P. 388–389.

11. Бресткин А.П., Кузнецова Л.П., Моралев С.Н., Розенгарт Е.В., Эпштейн Л.М. Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Институт эволюции физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр. Владивосток: ТИПРО-центр, 1997. 466 с.

12. Бресткин А.П., Иванова Л.А., Свечникова В.В. О торможении высокими концентрациями субстрата скорости гидролиза ацетилхолина под действием ацетилхолинэстеразы бычьих эритроцитов // *Биохимия*. 1965. Т. 30. С. 1154–1159.

13. Бресткин А.П., Брик И.Л. Активирующее влияние ионов тетраметиламмония и ацетилхолина на холинэстеразу лошадиной сыворотки // *Биохимия*. 1967. Т. 32. С. 3–12.

14. Бресткин А.П., Розенгарт Е.В., Соболева И.Н., Хромов-Борисов Н.В., Инденбом М.Л., Тихонова Л.Н., Абдувахабов А.А., Торемуратов К.И. О непродуктивном связывании субстратов холинэстеразы // *Доклад АН СССР*. 1972. Т. 205. С. 717–720.

15. Бресткин А.П., Розенгарт Е.В., Соболева И.Н., Хромов-Борисов Н.В., Тихонова Л.Н. Гидролиз холинэстеразами ацетилхолина с различной структурой аммониевой группировки // *Биохимия*. 1975. Т. 40. С. 95–102.

16. Brestkin A.P., Brick I.L., Grigor'eva G.M. Comparative pharmacology of cholinesterases // *Intern. Encycl, Pharmacol. Therap.* 1973. Sect. 85. Vol. 1. P. 241–344.

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

УДК 544.07, 543.06-08

Беляев А.П.^{1,2}, Антипов В.В.³

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России,

²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»,

Санкт-Петербург, Россия

Alexei.Belyaev@pharminnotech.com

ПЬЕЗОКВАРЦЕВОЕ МИКРОВЗВЕШИВАНИЕ ПАРОВ В АТМОСФЕРЕ

Сообщается о результатах исследования механизмов формирования аналитического сигнала при сенсорном пьезоэлектрическом микровзвешивании. В качестве модельной системы был выбран толуол в атмосфере ксилолов. Толуол и ксилолы относятся к нормируемым загрязнителям воздушного бассейна, негативно влияющим на мутагенез, кровеносную систему и костный мозг. К летальному исходу приводит аккумуляция этих веществ в организме уже на уровне 4–7 г/кг. Пожароопасен. Концентрационные пределы взрываемости паровоздушной смеси 1,3–6,7%. Пары толуола могут проникать через неповрежденную кожу и органы дыхания, вызывать поражение нервной системы, в том числе необратимое. Установлено, что форма аналитического сигнала удовлетворительно объясняется в рамках классической теории формирования конденсированных сред. Отдельные молекулы паровой атмосферы на модифицированной поверхности сенсора, формируют слой адсорбированных молекул, затем, при достижении критической концентрации из двумерного пара возникает ансамбль трехмерных зародышей жидкой фазы и происходит скачкообразное изменение упругих свойств вещества на поверхности подложки-датчика. Отсюда своеобразный вид аналитического сигнала: монотонный рост, нарушение монотонности кинетической кривой, ее излом и скачкообразный рост.

Результаты введения толуола в присутствии ксилолов статистически обработаны. Минимально определяемая концентрация толуола составила величину 0,03 г/м³, а предел обнаружения — 0,01 г/м³.

Ключевые слова: конденсированный слой, наноразмерные, пленки, пьезоэлектрический сенсор, атмосфера ксилолов, толуол.

Belyaev A.P.^{1,2}, Antipov V.V.³

¹*Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University,
St. Petersburg, Russia*

²*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,
St. Petersburg, Russia*

³*St Petersburg State Institute of Technology (Technical University),
St. Petersburg, Russia*

PIEZOQUARTZ MICROBALANCE OF VAPORS IN THE ATMOSPHERE

The results of a study of the mechanisms of analytical signal formation in piezoelectric sensor microweighing are reported. Toluene in a xylene atmosphere was chosen as a model system. Toluene and xylenes are among the normalized air pollutants that adversely affect mutagenesis, the circulatory system, and bone marrow. The accumulation of these substances in the body already at the level of 4–7 g/kg leads to death. Fire hazard. Concentration limits of explosiveness of vapour-air mixture are 1,3–6,7%. Toluene vapors may penetrate intact skin and respiratory organs, cause lesions of the nervous system, including irreversible.

It was found that the form of the analytical signal is satisfactorily explained within the framework of the classical theory of condensed media formation. Individual molecules of the vapor atmosphere on the modified sensor surface, form a layer of adsorbed molecules, then, when the critical concentration is reached, an ensemble of three-dimensional nuclei of the liquid phase emerges from the two-dimensional vapor and a jump change in the elastic properties of the substance on the sensor substrate surface occurs. Hence the peculiar appearance of the analytical signal: monotonic growth, violation of the monotonicity of the kinetic curve, its kink and jump-like growth.

The results of introducing toluene in the presence of xylenes were statistically processed. The minimum detectable concentration of toluene was 0,03 г/м³ and the detection limit was 0,01 г/м³.

Keywords: condensed layer, nanoscale, films, piezoelectric sensor, xylene atmosphere, toluene.

Введение. Физико-химические методы анализа, основанные на использовании свойств наноразмерных систем, в последние десятилетия получили широкое распространение для анализа самых разнообразных объектов и процессов [1–9]. Причина заключается в потенциальных возможностях подобных методик, открывающих перспективу экспрессного получения высокоточного результата без предварительной стадии пробоотбора и пробоподготовки. Среди подобного рода датчиков, детекторы на основе кварцевых резонаторов занимают особое место — они относятся к сверхчувствительным датчикам, позволяющим, при благоприятных условиях регистрировать отдельные молекулы [10]. В этой связи представляют интерес исследования, направленные на использование наноразмерных пленок для анализа атмосферы. Настоящая работа посвящена исследованиям возможностей метода для определения толуола в присутствии паров ксилолов. Толуол и ксилолы относятся к нормируемым загрязнителям воздушного бассейна, негативно влияющим на мутагенез, кровеносную систему и костный мозг. К летальному исходу приводит аккумуляция этих веществ в организме уже на уровне 4–7 г/кг [10]. Ниже представлены результаты исследования реализации метода для определения микроколичеств толуола и ксилолов в газовых смесях.

Экспериментальная часть. Аналитическим сигналом в предлагаемой методике являлся сдвиг частоты генератора, обусловленный наноразмерной пленкой молекул, возникающей при адсорбции газа на модифицированной поверхности пьезоэлектрического сенсора. Измерения проводились с помощью пьезокварцевого датчика с постоянной $A=1670$ кГц/мм. Датчик подключался к стандартному прибору КИТ-1, предварительно проградуированному на микроколичества толуола. Градуировочный график строился с использованием метода «введено-найдено».

Объекты анализа очищали по следующей методике. Толуол (0,5 л) встряхивали с 50 мл серной кислоты ($d=1,26 \times 10^{-3}$ г/м³) и удаляли кислоту; операцию повторяли до слабого окрашивания слоя кислоты. Диффузионная ячейка ввода пробы предусматривает непрерывное насыщение потока газа-носителя (очищенный и осушенный воздух) парами углеводородов. Испарение углеводородов происходит в термостатированном герметически закрытом сосуде, выполненном из кварцевого стекла. Максимальное насыщение газа-носителя углеводородами при прохождении через сосуд с жидким образцом достигается за счет мелкопористого распылителя. Для создания парогазовых смесей заданной концентрации в экспериментах использовали метод двух

давлений. Метод основан на том, что парциальное давление паров жидкости зависит только от температуры при условии, что полное давление парогазовой смеси в ячейке пробоподготовки не превышает атмосферного давления. При выходе газа-носителя из ячейки объем его увеличивается пропорционально понижению давления, а парциальное давление паров жидкости в той же мере уменьшается относительно давления при насыщении. При условии стабилизации температуры жидкости в ячейке пробоподготовки и обеспечения насыщения воздуха парами углеводорода жидкости обеспечивали непрерывный поток газовой смеси известной концентрации в детектор.

С целью повышения чувствительности и селективности сенсорного метода, аналитическим измерениям предшествовали исследования возможностей модификации поверхности сенсора. Изучались возможности модификации поверхности органическими оксидами и силиконами. Было установлено, что максимальную чувствительность к толуолу проявляет метилсиликоновое масло.

Результаты и их обсуждение. Определение толуола в присутствии ксилолов проводилось при модификации электродов сенсора 20 мкг метилсиликонового масла при расходе газа носителя $1,6 \times 10^{-6}$ м³/с. Анализируемую пробу, содержащую пары толуола и ксилолов, с помощью диффузионной ячейки вводили в детектор. Статистически обработанные результаты введения толуола в присутствии ксилолов представлены в табл. 1. Минимально определяемая концентрация толуола составила величину 0,03 г/м³, а предел обнаружения — 0,01 г/м³.

Таблица 1. Определение толуола в присутствии ксилолов (n=5; p=0,95)

№	Толуол, ω, г/м ³	
	введено	найдено
1	0,03	0,03±0,01
2	0,07	0,06±0,01
3	0,20	0,21±0,02
4	20,00	19±2
5	60,00	63±5
6	80,00	84±6
7	110,00	109±14

Для селективного определения толуола в присутствии ксилолов его содержание в анализируемой пробе должно быть не менее 23%.

В настоящей работе в качестве аналитического сигнала использовался сдвиг резонансной частоты пьезоэлектрического резонатора Δf , вносимый пленкой из молекул паровой фазы, возникающей за счет сил

адсорбции на поверхности пьезоэлектрического датчика. Установление равновесного значения аналитического сигнала характеризовалось кинетической кривой, со слабо выраженной областью нарастания и ярко выраженным насыщением (рис. 1).

Чтобы объяснить ее, рассмотрим процесс формирования сигнала. Принцип работы пьезоэлектрического сенсора заключается в том, что резонансная частота пьезоэлектрического кристалла f зависит от его эффективной толщины h [11]:

$$f = v / (2h) \quad (1), \text{ где } v \text{ — скорость звука в кристалле.}$$

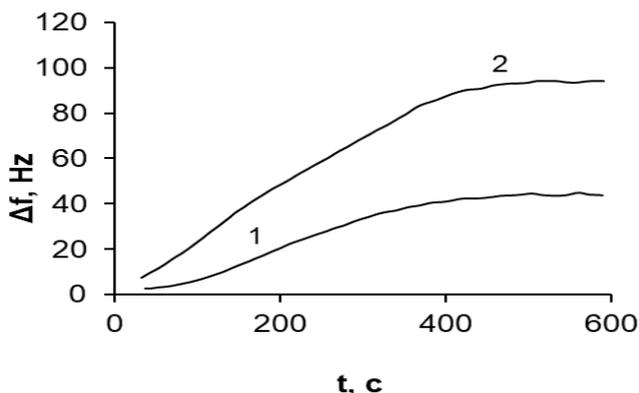


Рис. 1. Кинетические кривые аналитического сигнала при определении толуола при температуре $T=295\text{K}$. 1 — $\omega=0,03 \text{ г/м}^3$; 2 — $\omega=110,0 \text{ г/м}^3$

Как можно видеть из (1), эта зависимость представляет собой не что иное, как условие возникновения стоячих волн внутри кристалла толщиной h . Отсюда очевидно, что реально величина h носит эффективный характер, поскольку она должна учитывать не только геометрическую толщину кристалла, но и состояние его поверхностей, отражающих акустические волны.

В обсуждаемом эксперименте на модифицированной поверхности кварцевого кристалла формировалась пленка из адсорбированных молекул газа. Свойства пленки (толщина, тип (островковая, сплошная), морфология поверхности, природа вещества, упругие характеристики) вносили вклад в эффективную толщину кристалла и тем самым вызывали сдвиг резонансной частоты Δf . Исходя из вышеизложенного, можно констатировать, что кинетика аналитического сигнала Δf в процессе анализа одновременно отражает и изменения акустических

свойств самих пленок. В связи с этим более подробно рассмотрим кинетику изменения аналитического сигнала на начальном участке.

Молекулы паровой атмосферы на модифицированной поверхности сенсора, формируют пленки, растущие путем нормального послонного роста, о чем свидетельствовали изображения поверхности, получаемые нами в силовом микроскопе. На первой стадии роста, на поверхности образуется слой адсорбированных молекул. Этому соответствует монотонное увеличение Δf . Затем, при достижении критической концентрации из двумерного пара адсорбированных молекул, возникает ансамбль трехмерных зародышей жидкой фазы и происходит скачкообразное изменение упругих свойств вещества на поверхности подложки-датчика. Отсюда нарушение монотонности кинетической кривой, ее излом и скачкообразный рост аналитического сигнала Δf , который определяется, в частности, акустическими характеристиками вещества.

В результате образования островков новой фазы концентрация адсорбированных молекул на подложке понижается и зародышеобразование прекращается. Однако от источника продолжает поступать пар. Вследствие чего концентрация адсорбированных молекул на поверхности датчика вновь начинает возрастать. Этому процессу на кинетической кривой соответствует следующий участок монотонного увеличения Δf . В момент, когда концентрация вновь достигнет критической, происходит вторичное зародышеобразование. Его сопровождает резкое изменение упругих свойств, которое на кинетической кривой дает новый всплеск Δf . Однако, поскольку относительный вклад новых островков в объем формирующейся островковой пленки в этом случае будет меньше, то и скачок аналитического сигнала на кинетической кривой получается меньшей амплитуды. Очевидно, что в дальнейшем описанный процесс будет повторяться вплоть до установления равновесия между паровой и конденсированной фазой (область насыщения на рис. 1).

Выводы. Представленные результаты позволяют констатировать, что сенсорные методы пьезокварцевого взвешивания являются эффективным и экспрессным методом определения микроколичеств вещества, позволяющих производить мониторинг состояния атмосферы, кинетика формирования аналитического сигнала которых успешно описывается в рамках классической теории зарождения и роста пленочных систем.

Список литературы

1. Беляев А.П., Рубец В.П., Антипов В.В. Свойства нитевидных нанокристаллов сульфида кадмия, синтезированных путем вакуумного

испарения и конденсации // *Бутлеровские сообщения*. 2019. Т. 57, № 1. С. 149–153. ROI: jbc-01/19-57-1-149.

2. Беляев А.П., Антипов В.В., Мохоров Д.А. Состав паровой фазы при испарении механической смеси порошков селенотеллуридов кадмия и цинка // *Бутлеровские сообщения*. 2020. Т. 63. № 8. С. 80–85. ROI-jbc-01/20-63-8-80. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/20-63-8-80.

3. Sui N., Zhang P., Cao S., Zhou T., Zhang T. Nanosheet-assembled In_2O_3 for sensitive and selective ozone detection at low temperature // *Journal of Alloys and Compounds*. 2021. Vol. 88825. December. № 161430.

4. Tang S., Yu C., Qian L., Zhou C., Zhen Z., Liu B., Cheng X. Cheng Nitrogen-doped graphene quantum dots-MoS₂ nanoflowers as a fluorescence sensor with an off/on switch for intracellular glutathione detection and fabrication of molecular logic gates // *Microchemical Journal*. 2021. Vol. 171. December. № 106786.

5. Wang G., Chen H., Wu Y. Influence of heat disturbance on the performance of YSZ based CO₂ sensor with compound of Li₂CO₃-BaCO₃-Nd₂O₃ as auxiliary sensing electrode // *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*. 2020. Vol. 23, № 4. P. 244–25131. December 2020.

6. Tan J., Liu S., Luo J., Li H. Well-ordered polystyrene colloidal spheres for light addressable potentiometric sensor // *Thin Solid Films*. 2020. Vol. 71631 December. № 138417.

7. Lim K., Jo Y M., Kim S., Yoon J W., Jeong Y., Kim J S., Choi H.J., Cho Y., Park J., Jeong Y.W., Lee J.-H. Selective dual detection of hydrogen sulfide and methyl mercaptan using CuO/CuFe₂O₄ nanopattern chemiresistors // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2021. Vol. 3481. December. № 130665.

8. Belyaev A.P., Rubets V.P., Kukushkin S.A. Sensor Studies of the Initial Stages of the Cadmium Telluride Film Formation through Vapor Deposition // *Physics of the Solid State*. 2001. V. 43. № 10. P. 1979–1982.

9. Ashurbekova Kr. N., Ashurbekova K. N., Saric I., Gobbi M., Modin E., Chuvilin A., Petravie M., Abdulagatov I., Knez M. Ultrathin hybrid SiAlCOH dielectric films through ring-opening molecular layer deposition of cyclic tetra siloxane // *ACS Chemistry of Materials*. 2021. Vol. 33. № 3. P. 1022–1030.

10. Данцер К. Аналитика. Систематический обзор. М.: Химия, 1981. 278 с.

11. Малов В.В. Пьезорезонансные датчики. М.: Энергоатомиздат, 1989. 271 с.

УДК 547.442.3

Васильева Н.Г., Козлова-Козыревская А.Л., Огейко Н.Г.
УО «Белорусский государственный педагогический университет
имени Максима Танка»,
Минск, Беларусь
ogeiko@rambler.ru, kozyrevskaya@tut.by

К ВОПРОСУ СИНТЕЗА ДЖЕНЕРИКОВ

Синтез новых лекарственных препаратов и так называемых дженериков является важной задачей органической и биорганической химии, так как это позволяет решать вопрос сохранения здоровья населения.

Ключевые слова: органическая химия, аналог, дженерики, патент.

Vasilyeva N.H., Kozlova-Kozyrevskaya A.L., Ogeiko N.H.
EI «The Belorussian State Pedagogical University named Maksim Tank»,
Minsk, Belarus

ON THE ISSUE OF DRUG SYNTHESIS

The synthesis of new drugs and the so-called generics is an important task of organic and bioorganic chemistry, as it allows solving the problem of preserving the health of the population.

Keywords: organic chemistry, analogue, generics, patent.

Органическая химия на современном этапе — это не только теоретическая наука, но и прикладная, причем второй аспект ничуть не менее важен, чем первый. И связан этот аспект, в первую очередь, с синтезом биоактивных веществ.

Так, интерес многих научно-исследовательских учреждений связан с разработкой эффективных схем синтеза лекарственных препаратов.

Не секрет, что, например, эффективность многих антибиотических и противовирусных препаратов снижается в связи с адаптацией микробов к ним. В этой связи часто удается «обманывать» микроорганизмы путем модификации структуры действующего вещества известного лекарственного препарата путем замены некоторых функциональных групп. Таким образом, например, синтезируются новые простагландины, глутаримидные антибиотики [1].

Другим направлением в прикладной органической химии является синтез так называемых дженериков. Почему?

Совершенно понятно, что изобретение совершенно нового лекарства, потом испытания (как лабораторные, так и последующие клинические исследования в отечественных клиниках) и, наконец, регистрация

(и получение патента в том числе) занимают длительный промежуток времени (иногда до 15 лет). Созданный же отечественный препарат с аналогичным импортному препарату действующим веществом (количество действующего вещества также аналогично), выведенный на рынок по истечении срока патентной защиты оригинала будет называться дженериком. И, несмотря на экономические затраты по созданию таких аналогов, конечные затраты могут оказаться ниже импортных лекарств (правда, не всегда).

Так, существует оригинальное лекарство Арбидол, производимое в России. В 2007 г. у него закончилась действие патента, что позволило в Беларуси абсолютно законно разработать препарат-дженерик Арпетол. Следует отметить, что у двух этих препаратов одинаковое международное непатентованное название, а вот упаковка — разная [2]. Также в продаже есть Ибупрофен и его дженерик Нурофен. В мире на самом деле производится довольно много подобных препаратов.

Следует отметить, что к эффективности дженериков предъявляются те же требования в плане эффективности и качества [3]. Применение идентичного основного ингредиента в составе дженерика не гарантирует абсолютно идентичный результат [4]. Это может объясняться следующими особенностями дженерика:

- состав дополнительных компонентов (так называемых вспомогательных веществ) — они используются в любом лекарстве, необходимы, например, для придания лекарственной формы (таблетка, капсула или мазь), обеспечения быстрой растворимости или т.п.;
- качество действующего вещества, т.е. чистота, или процент примесей, который может варьировать.

Таким образом, аналоги также проходят проверку на качество. И фармацевтическая организация, производящая дженерик, должна подтвердить, что его эффективность сравнима с оригинальным препаратом. Так, некоторые лекарства-дженерики по терапевтическому эффекту должны соответствовать оригиналу (например, сердечные препараты). В этом случае проводятся клинические испытания на пациентах, а не только биохимический состав крови пациентов подвергается исследованию.

Более мягкие требования предъявляются к тем лекарствам, которые не всасываются в кровь. Это, например, кожные мази, глазные капли. В этом случае для компании, производящей аналог, достаточно доказать, что состав препарата соответствует оригиналу.

В целом следует отметить, что и производство совершенно новых лекарственных препаратов, и дженериков — это весьма необходимая задача в органической химии, так же как сохранение здоровья людей

является одним из важнейших направлений в химии (в частности, в органической, биоорганической и неорганической химиях).

Список литературы

1. Васильева Н.Г., Козлова-Козыревская А.Л. К вопросу синтеза лекарственных препаратов // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сб. науч. тр. 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2–3 декабря 2021 г. / под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2021. С. 56–59.
2. Белоусов Ю.Б. Дженерики — мифы и реалии // *Remedium*. 2003. С. 4–9.
3. Рудык Ю.С. К вопросу о терапевтической эквивалентности лекарственных средств // *Рациональная фармакотерапия*. Киев. 2007. С. 40–48.
4. Максимов М.Л. Выбор между оригиналом и дженериком в повседневной практике // *Лечебное дело*. 2012. С. 44–50.

УДК 547.14

Гулёнова М.В.¹, Пискунова М.С.¹, Жданович И.В.¹, Пиманова Н.А.²

¹ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России

²ФГБОУ ВО «НГПУ им. К. Минина» (Мининский университет),
Нижний Новгород, Россия

E-mail: gulmv@rambler.ru, pimar@citydom.ru, jiv62@list.ru,
chem-vsem@yandex.ru

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ ОКИСЛЕНИЕ 3,6-ДИ-ТРЕТ- БУТИЛ-О-БЕНЗОХИНОНА И 3,6- ДИ-ТРЕТ- БУТИЛПИРОКАТЕХИНА ТРЕТ-БУТИЛГИДРОПЕРОКСИДОМ В ПРИСУТСТВИИ ТРЕТ-БУТОКСИДОВ АЛЮМИНИЯ, ТИТАНА И ЦИРКОНИЯ

Системы трет-бутилат алюминия, титана или циркония — трет-бутилгидропероксид в мягких условиях (комнатная температура, бензол) окисляют 3,6-ди-трет-бутил-о-бензохинон. Основным продуктом реакции в случае (t-BuO)₃Al и (t-BuO)₄Zr является 5-гидрокси-3,6-ди-трет-бутил-2,3-эпокси-р-бензохинон, для (t-BuO)₄Ti — 2-гидрокси-3,6-ди-трет-бутил-р-бензохинон. В указанных условиях 3,6-ди-трет-бутилкатехол превращается в 3,6-ди-трет-бутил-о-бензохинон. Процессы протекают с участием металлосодержащих пероксидов.

Ключевые слова: окисление, металлосодержащие пероксиды, 3,6-ди-трет-бутил-о-бензохинон, эпоксидированный продукт.

Gulnova M.V.¹, Piskunova M.S.¹, Zhdanovich I.V.¹, Pimanova N.A.²

E-mail: gulmv@rambler.ru, pimar@citydom.ru, jiv62@list.ru,
chem-vsem@yandex.ru

¹Privolzhsky Research Medical University

²Minin Nizhny Novgorod State Pedagogical University,
Nizhny Novgorod, Russia

LOW-TEMPERATURE OXIDATION OF 3,6-DI-TERT-BUTYL- ORTHO- BENZOQUINONE AND 3,6-DI-TERT-BUTYL CATECHOL WITH TERT-BUTYL HYDROPEROXIDE IN THE PRESENCE OF ALUMINUM AND TITANIUM TERT- BUTOXIDES

Systems on the base of tert-butoxide of aluminum or titanium with tert-butyl hydroperoxide oxidize 3,6-di-tert-butyl-ortho-benzoquinone (benzene, rt). The major product is 5-hydroxy-3,6-di-tert-butyl-2,3-epoxy-1,4-benzoquinone in the presence of Al(OBu-t)₃, and 2-hydroxy-3,6-di-tert-butyl-1,4-benzoquinone in case of Ti(OBu-t)₄. At the same conditions 3,6-di-tert-butylcatechol transforms to 3,6-di-tert-butyl-ortho-benzoquinone. Metal-containing peroxides take part in the processes of oxidation.

Keywords: oxidation, metal-containing peroxides, 3,6-di-tert-butyl-ortho-benzoquinone, epoxy-product.

Взаимодействие пространственно-затрудненных *o*-бензохинонов и соответствующих пирокатехинов с пероксипроизводными (H₂O₂, перокси кислоты, гидропероксиды) приводит к различным продуктам в зависимости от природы окислителя и условий процессов. Эпоксидированные хиноны представляют особый интерес, поскольку обладают биологической активностью. Они находят широкое применение в биологии, фармакологии, и как ключевое промежуточное звено в синтезе различных важнейших органических соединений [1].

3,6-Ди-*трет*-бутил-*o*-бензохинон (1) и 3,6-ди-*трет*-бутилпирокатехин (2) реагируют с *трет*-бутилгидропероксидом (3) при 70 и 90°C. Выделен ряд продуктов, основными из которых являются 3,6-ди-*трет*-бутил-1-оксациклогепта-3,5-диен-2,7-дион (15–30%) и 2-гидрокси-3,6-ди-*трет*-бутил-*p*-бензохинон (10-60%). Авторы полагают, что процесс окисления хинона (1) и пирокатехина (2) гидропероксидом (3) включает преимущественно радикальные стадии, приводящие к промежуточному образованию *o*-семихинона и *трет*-бутилпероксильного радикала. Результатом их дальнейшего взаимодействия являются указанные соединения [2].

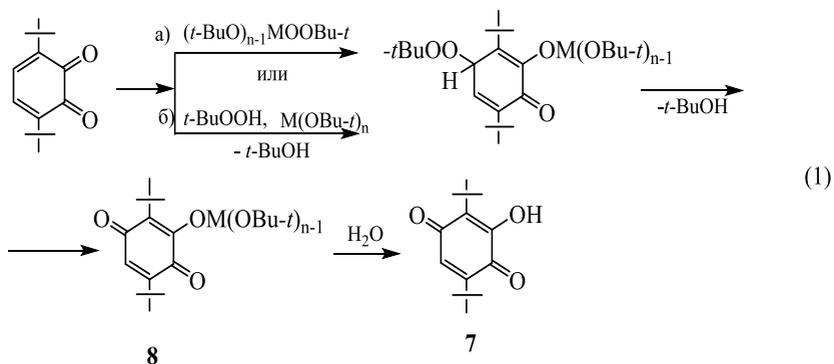
Поиск систем низкотемпературного (10–20 °C) окисления органических субстратов с целью синтеза новых соединений является одной

из важнейших проблем органической химии. В настоящей работе исследовано взаимодействие хинона (1) и пирокатехина (2) с окислительными системами *t*-BuOOH — *трет*-бутилат алюминия (4), титана (5) и циркония (6).

Ранее показано, что реакции компонентов окислительных систем на базе *трет*-бутилатов алюминия (4), титана (5) и циркония (6) (1:2, C₆H₆, 20 °С) с *t*-BuOOH протекают через образование металлсодержащих пероксидов (*t*-BuO)_{*n*-1}MOOBu-*t* и триоксидов (*t*-BuO)_{*n*-1}MOOOBu-*t*. Разложение последних сопровождается выделением кислорода, а также гомолизом с образованием алкокси- и пероксирадикалов, идентифицированных методом ЭПР. Системы на основе (4) — (6) являются эффективными окислителями различных классов органических соединений (алканы, алкиларены, алкены, спирты, простые и сложные эфиры предельного и непредельного ряда) [4]. В зависимости от строения исходного субстрата окислителем выступает либо кислород, генерируемый системами, либо пероксиды (*t*-BuO)_{*n*-1}MOOBu-*t* или триоксиды [3].

Реакции (1) и (2) с системами (3) — алкоголят (4) — (6) проводили в бензоле (комнатная температура) и соотношении компонентов 1:2:1. Показано, что в данных условиях (1) и (2) не взаимодействуют ни с (3), ни с алкоголятами металлов.

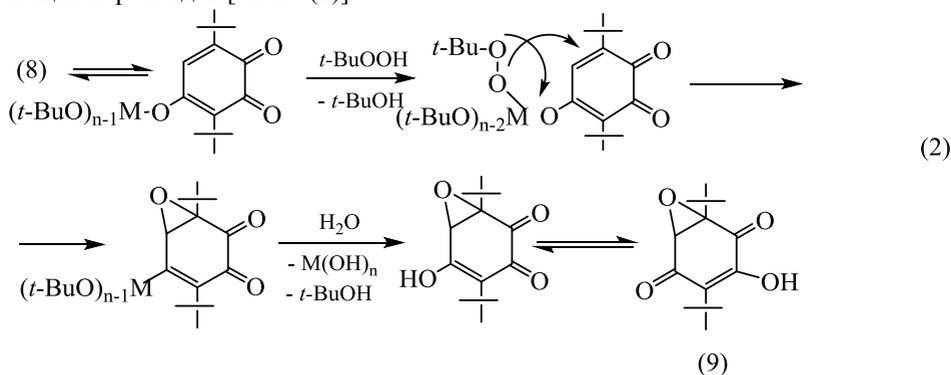
В случае 3,6-ди-*трет*-бутил-*о*-бензохинона процесс окисления идет преимущественно с образованием на первой стадии 2-гидрокси-3,6-ди-*трет*-бутил-*р*-бензохинона (7), который для алкоголята (5) достигает 75%, а для алкоголятов (4) и (6) не превышает 8 — 15% соответственно. При взаимодействии мономерного Ti(OBu-*t*)₄ с *трет*-бутилгидропероксидом имеет место выделение кислорода с высокой скоростью. Мы полагаем, что образование хинона (7) осуществляется по реакции нуклеофильного 1,4-присоединения либо металлсодержащего пероксида, либо *трет*-бутилгидропероксида с последующей реакцией гидроксигруппы с алкоголятом металла по системе сопряженных связей, включающих одну из карбонильных групп [схема (1)].



M= Al, n=3; Ti, Zr, n=4

В результате гидролиза окраска реакционного раствора изменяется от вишнево-красной до желтой, характерной для (7), подтверждая присутствие алкоксипроизводного хинона (8).

Схема (1) реализуется для алкоколятов (4) — (6). Однако в случае *трет*-бутоксидов алюминия и циркония имеет место дальнейшее взаимодействие (8) с *трет*-бутилгидропероксидом, что приводит к ранее не описанному 5-гидрокси-3,6-ди-*трет*-бутил-2,3-эпокси-*p*-бензохинону (9) с выходом, близким к количественному (90-95%). Изомер хинона (8) подвергается эпоксированию, поскольку известно, что в растворах *o*- и *p*-гидроксихиноны находятся в термодинамическом равновесии [4]. Процесс эпоксирования осуществляется по аллильному положению через стадию алюминий- или цирконийсодержащих пероксидов [схема (2)].



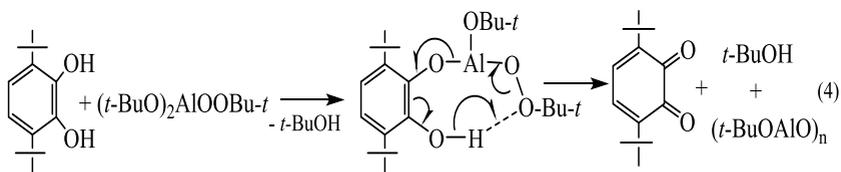
Внутримолекулярное эпоксидирование в аллильное положение гидропероксидами в присутствии алколюатов алюминия и титана используется для получения эпоксидированных спиртов аллильного типа.

С целью доказательства участия металлсодержащих пероксидов в процессах образования хинонов (7) и (9), представленных на схемах (1) и (2), проведены модельные реакции $(t\text{-BuO})_2\text{AlOObu-t}$ (10) с хинонами (1) и (7) [1:1, C_6H_6 , 20°C]. При взаимодействии (2) с $(t\text{-BuO})_2\text{AlOObu-t}$ (1:1, C_6H_6 , rt) выделено 0,60 моль (4) и 0,26 моль (8), что служит подтверждением образования (4) на первой стадии. ИК и ПМР спектры последнего идентичны литературным.

Взаимодействие (4) с системой (1)–(5) (C_6H_6 , rt, 1:1:1) приводит к (8) с выходом 90%. Вещество охарактеризовано ИК, ЯМР (^{13}C) и ПМР спектроскопией, а также рентгеноструктурным анализом.

Таким образом, взаимодействие систем (1)–(5) и (1)–(6) с хиноном (2) осуществляется преимущественно как нуклеофильное 1,4-присоединение металлсодержащего пероксида по системе сопряженных связей. Алюминийсодержащий пероксид далее эпоксидирует аллильное положение с образованием гидрокси(эпокси)хинона.

Пирокатехин (3) также окисляется системами (1)–(5) и (1)–(6). Первичным продуктом является хинон (2), образование которого может быть обусловлено как гомолитическими реакциями, так и непосредственным взаимодействием металлсодержащих пероксидов с пирокатехином (3). Действительно, основным продуктом взаимодействия (3) с $(t\text{-BuO})_2\text{AlOObu-t}$ (1:1, rt) является хинон (2) (0,71 моль). Найден также хинон (4) (0,07 моль). Для окисления хинона может быть предложена схема 4.



Схема, включающая моноалкоксисоединение металла, предлагалась ранее для окисления катехолов до хинонов гидропероксидом (1) в присутствии солей рутения [1].

Однако указанный хинон обнаружен в обоих случаях в небольших количествах, поскольку имеет место его дальнейшее окисление, описываемое схемами 2,3. В случае (6) выделен хинон (4) с выходом 0,76

моль, а для (5) — 0,55 моль (4) и 0,20 моль (8). Хинон (2) обнаружен в обоих случаях.

Список литературы

1. Marco-Contelles J., Molina M.T., Anjum S. Naturally Occurring Cyclohexane Epoxides: Sources, Biological Activities, and Synthesis // Chem. Rev. 2004. Vol. 106, № 4. P. 2857–2899.

2. Глушакова В.Н., Скородумова Н.А., Неводчиков В.И., Абакумова Л.Г., Макаренко Н.П., Черкасов В.К., Дружков Н.О. Реакции 3,6-ди-*трет*-бутил-1,2-бензохинона и 3,6-ди-*трет*-бутилпирокатехина с *трет*-бутилгидропероксидом // Изв. РАН. Серия химическая. 1999. № 5. С. 943–947.

3. Степовик Л.П., Мартынова И.М., Додонов В.А., Черкасов В.К. Исследование методом ЭПР термического разложения ди-(трет-бутокси)алюмо-третбутилтриоксида, образующегося при взаимодействии три-трет-бутилата алюминия с трет-бутилгидропероксидом. // Изв. АН. Серия химическая. 2002. № 4. С. 590–595.

4. Вольева В.Б., Новикова И.А., Иванова Е.В., Ершов В.В. Окисление и алкоксилирование 3,6-ди-*трет*-бутилпирокатехина, катализируемое диацетатом марганца // Изв. АН СССР. Серия химическая. 1986. № 1. С. 215–218.

УДК 547.9

Дадали В.А., Соколова Е.А., Степанова Н.П.
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
VDadali@mail.ru, Elena.Sokolova@szgmu.ru,
Natalya.Stepanova@szgmu.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АПОКАРОТИНОИДОВ *CROCUS* *SATIVUS* L.-ПРОТЕКТОРОВ ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

В работе проведен анализ и идентификация апокаротиноидов (кроцинов и кроцетина) экстрактов шафрана (Crocus Sativus L., Iridaceae) методом тонкослойной хроматографии. Обсуждаются некоторые молекулярные аспекты протекторного действия кроцинов и кроцетина при коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: апокаротиноиды, кроцины, кроцетин, интерлейкины, NF-κB, цитокины, коронавирусная инфекция.

Dadali V.A., Sokolova E.A., Stepanova N.P.

*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
department of biological and general chemistry named after
V.V. Sokolovsky,
St. Petersburg, Russia*

THE USE OF THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY FOR THE DETECTION OF *CROCUS SATIVUS L.* APOCAROTINOIDS- PROTECTORS IN CORONAVIRUS INFECTION

*The paper analyzes and identifies apocarotinoids (crocin and crocetin) of saffron (*Crocus Sativus L.*, Iridaceae) extracts by thin-layer chromatography. Some molecular aspects of the protective action of crocins and crocetin in coronavirus infection are discussed.*

Keywords: *apocarotinoids, crocins, crocetin, interleukins, NF- κ B, cytokines, coronavirus infection.*

Актуальность. В последние годы (2019–2022 гг.) в научной литературе возросло число работ, посвященных исследованию протекторного действия апокаротиноидов кроцинов и кроцетина шафрана (*Crocus sativus L.* (Iridaceae)) в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, а также доклиническим исследованиям этих соединений при различных штаммах коронавирусной инфекции [1]. Препараты кроцинов и транс-кроцетината натрия (TSC, Merck-Sigma-Aldrich) в настоящее время могут быть получены дорогостоящими и трудоемкими методами многостадийного органического синтеза [2], но единственным доступным источником апокаротиноидов пикрокроцина, сафранала, кроцинов и кроцетина до сих пор является пряность шафран (рыльца цветов *Crocus sativus L.*). Поскольку натуральный шафран — крайне дорогой продукт, часто предлагаются внешне похожие на него подделки, что, учитывая возможность указанного выше лечебного применения апокаротиноидов шафрана, диктует необходимость разработки доступного метода его идентификации и определения подлинности.

Целью работы стало определение содержания апокаротиноидов и их идентификация в экстрактах шафрана методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), а также анализ литературных данных о биохимическом действии этих соединений при коронавирусной инфекции.

Введение. Апокаротиноиды шафрана, продукты эксцентрического расщепления каротиноидов, обладают рядом полезных биологических свойств. Известны их антиоксидантные, кардиопротекторные, противораковые, иммуномодулирующие, противовоспалительные, нейропротекторные и другие свойства, предопределяющие исследования в

области применения этих соединений при коронавирусной инфекции. Основным методом определения апокаротиноидов в природных объектах является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым или масс-спектрометрическим детектированием [3]. Однако наиболее простым и дешевым является метод ТСХ, который и использовался в данной работе.

Материалы и методы исследования. Пробы (50 мг) шафрана экстрагировали в течение 24-48 часов при комнатной температуре 25 °С в темноте. При необходимости пробы измельчали или гомогенизировали. Для экстракции использовали системы растворителей:

а) метанол/ацетонитрил, 38:62 (v/v%);

б) гексан, чда;

в) метанол, 50% водный;

г) этанол, 80% водный.

Элюирующие жидкости:

а) бутанол-1 (чда): уксусная кислота (лед): вода (дист.), 4:1:1;

б) этилацетат (чда): пропанол-2 (чда): вода (дист.), 65:25:10.

Пластины для тонкослойной хроматографии (10 × 10 см):

а) «Silufol, УФ-254», Чехия. ООО ПКФ «Минкар»;

б) «Армсорб», РЕА АРМСОРБ Хром для ТСХ, УФ-254. ТУ 6-09-370918-88;

в) «Sorbfil» ЗАО Сорбполимер, г. Краснодар. ТУ 26-11-17-89;

г) «Polyamide-TLC 6UV-254».

Объекты исследования — шафран натуральный (Иран, 10.02.2022. Kotany GmbH, A-2120. Австрия); образцы шафрана производства Индии, Азербайджана и Средней Азии. Для измерения поглощения в УФ и видимой области спектра использовали спектрофотометры СФ-46 и Solar PV 1251С.

Результаты и их обсуждение. Из 4 объектов исследования только натуральный шафран (Иран) содержит апокаротиноиды, что является подтверждением его подлинности. Хроматографический анализ остальных образцов пряности показал наличие похожей по окраске куркумы.

Наиболее эффективной оказалась экстракция измельченного натурального шафрана смесью метанола и ацетонитрила в соотношении 38:62 (v/v%) [4] в течение 24 часов. Применение водно-спиртовых растворов [5, 6] дает менее окрашенные экстракты, очевидно, содержащие меньшую концентрацию пигментов апокаротиноидов.

В элюирующей системе растворителей этилацетат: пропанол-2: вода (65:25:10, v/v/v,%) эффективного разделения апокаротиноидов не наблюдается. Наилучшее разделение компонентов экстракта достига-

ется при использовании в качестве элюента смеси растворителей бутанол-1 (чда): уксусная кислота (лед): вода (дист.) (4:1:1, v/v/v,%) на пластинах «Silufol» и «Армсорб» (рис. 1, табл. 1). Для всех фракций в выбранной системе растворителей на пластинах а, б (табл. 1) значение $\Delta R_f \geq 0,1$.

Визуально на пластинах «Silufol» (рис. 1А) и «Армсорб» выявляются 5 компонентов экстракта в виде желтых пятен. Окрашивание йодом позволяет визуализировать еще 2 компонента, не поглощающие в видимой области спектра. На пластинах «Sorbfil» (рис. 1Б) выявляются 7 компонентов с недостаточным разрешением. Следует отметить, что окраска пятен на свету постепенно исчезает, так как апокартиноиды чувствительны к воздействию света, поэтому работа с ними должна проводиться в условиях пониженной освещенности.

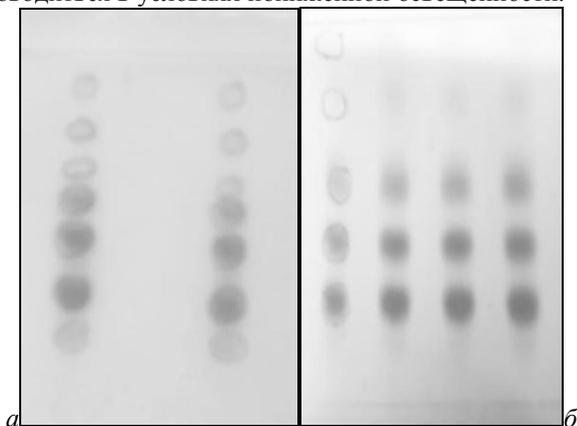


Рис. 1. Хроматограммы экстракта шафрана. Элюент: бутанол-1 (чда): уксусная кислота (лед): вода (дист.) (4:1:1, v/v/v,%) на пластинах «Silufol», (а); и «Sorbfil» (б)

Результаты ТСХ на пластинах (а–в) в системе растворителей (бутанол-1 (чда): уксусная кислота (лед) вода (дист.), 4:1:1) приведены в табл. 1. Разделения апокартиноидов на пластинах полиамида (г) не наблюдалось.

Увеличение количества полярного растворителя в элюенте существенно влияет на хроматографическую подвижность компонентов, характеризуемую величиной R_f (рис. 2), особенно полярных дигликозил-содержащих транс-кроцинов-4, -3 и 2' (компоненты 1–3).

Таблица 1. Результаты ТСХ экстракта шафрана

№ п/п фракции	Пластины для ТСХ	Rf	N	H	Rs	α
1	а	0,30	178	0,11	1,86	0,66
	б	0,41	538	0,05	2,00	0,76
	в	0,40	900	0,03	1,75	0,80
2	а	0,46	289	0,12	1,25	0,79
	б	0,54	973	0,04	1,60	0,84
	в	0,50	1444	0,03	2,00	0,83
3	а	0,58	506	0,09	2,31	0,76
	б	0,64	1475	0,03	2,67	0,81
	в	0,60	1354	0,03	1,33	0,87
4	а	0,76	2228	0,03	2,44	0,85
	б	0,79	3721	0,02	2,25	0,86
	в	0,69	2809	0,02	1,67	0,92
5	а	0,89	5041	0,01	2,44	0,85
	б	0,92	4761	0,01	2,25	0,86
	в	0,75	13924	0,04	3,00	0,90
6	а	-	-	-	-	-
	б	-	-	-	-	-
	в	0,84	16900	0,004	2,8	0,91
7	а	-	-	-	-	-
	б	-	-	-	-	-
	в	0,93	9472	0,003	2,8	0,91

Поскольку значение Rf зависит от условий эксперимента: типа сорбента, состава подвижной фазы, температуры, времени и других, эффективность хроматографического разделения оценивали с помощью основных параметров ТСХ по числу (N) эквивалентных теоретических тарелок, их высоте (H), а также по степени (Rs) и селективности (α) разделения компонентов. По этим параметрам для дальнейшей работы были выбраны пластины «Silufol» и «Армсорб».

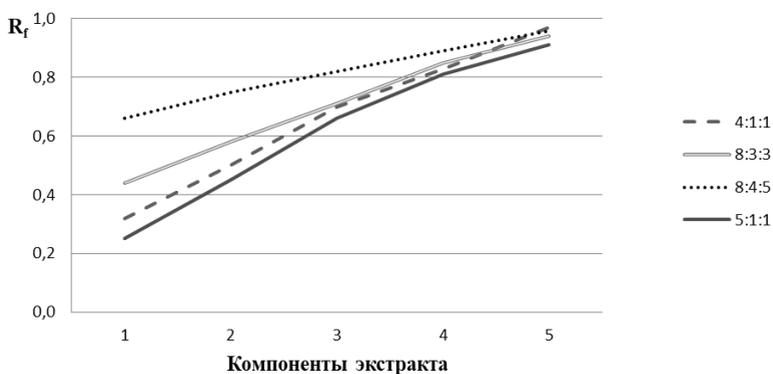


Рис. 2. Хроматографическая подвижность фракций экстракта шафрана в системе бутанол-1 : уксусная кислота : вода при различных соотношениях растворителей

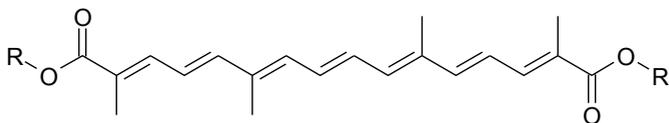
Идентификация компонентов экстракта

Ввиду отсутствия эталонов апокаротиноидов, можно предположить наличие кроцинов в экстракте на основе их спектральных характеристик [4].

Окрашенные зоны разделенных компонентов элюировали с пластин «Silufol» 96% этанолом и записывали спектры поглощения в УФ и видимой области (табл. 2).

Таблица 2. Идентификация апокаротиноидов шафрана

№ фракции	Rf «Silufol»	Предполагаемые компоненты экстракта шафрана (λ_{max})
1	0,30	Транс-кроцин 4 (260, 436, 462 нм)
2	0,46	Транс-кроцин 3, транс-кроцин 4 (265, 436, 462 нм)
3	0,58	Цис-кроцин 4, транс-кроцин 2' (262, 322, 433, 458 нм) (пикрокроцин, λ_{max} =240 нм)
4	0,76	Цис-кроцин 4, транс-кроцин 2 (265, 288, 320, 435, 460 нм)
5	0,89	Цис-кроцин 2 (260, 281, 430, 456 нм)



Кроцетин: 2,6,11,15-тетраметилгексадека-2,4,6,8,10,12,14-гептаендиовая кислота, R=H; кроцин-4: дигентиобиозил**кроцетин**; кроцин-3:

- 1-β,D-глюкопиранозил-16-гентиобиозил**кроцетин**; кроцин-2':
- ди-β,D-глюкопиранозил**кроцетин**; кроцин-2: моногентиобиозил**кроцетин**.

Апокаротиноиды шафрана имеют характерные полосы поглощения:

- пикрокроцин и его производные поглощают в УФ области вблизи 240 нм;
- цис- и транс-кроцины поглощают при $\lambda_{\max}=440, 260-264$ нм; цис-кроцины дополнительно поглощают свет в диапазоне $\lambda_{\max}=320-340$ нм; транс-кроцины проявляют небольшое поглощение при 260–264 нм. Фракция № 3 может содержать пикрокроцин и его производные с поглощением $\lambda_{\max}=240$ нм. Этот компонент не окрашен и визуально не определяется.

Кроцины как протекторы при коронавирусной инфекции

В современной научной литературе кроцины и кроцетин рассматриваются как природные вещества, способные выполнять протекторную функцию при коронавирусной инфекции. Эти апокаротиноиды ингибируют репликацию некоторых вирусов, схожих с коронавирусом; облегчают диффузию кислорода к тканям, защищают от развития тромбозмболии, цереброваскулярных, респираторных заболеваний и, тем самым, способны предотвращать осложнения при перенесенной коронавирусной инфекции. В экспериментах *in vivo* показано, что применение кроцина в дозе 50–150 мг/кг массы может подавлять развитие цитокинового шторма, вызванного коронавирусом COVID-19. Кроцины снижают уровень провоспалительных цитокинов: IL-1β, IL-6, IL-12, IL-17A, IFNγ, TNFα [7], воздействуют на TLR4/TRIF/NF-κB сигнальный путь, подавляют процессы воспаления, приводящие к поражению органов и тканей в результате последствий коронавирусной инфекции [8]. Квантово-механический расчет [9] показывает, что кроцины способны ингибировать главную протеазу коронавируса, связываясь с S-белком («шип» белком) SARS-CoV2, что препятствует слиянию мембран вируса и клетки-мишени. Активируя Nf2 сигнал-

ный путь, кроцины, подавляют экспрессию гена ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), что нарушает связывание S-белка с ACE2 и транспорт вируса в клетку-мишень [10].

Вывод. Показано использование метода ТСХ для определения подлинности образцов шафрана на основе анализа его апокаротиноидного состава. В экстракте шафрана (*Crocus sativus* L.) методом ТСХ выявлено и идентифицировано с использованием спектральных характеристик 5 фракций кроцинов. Проведен анализ литературных данных о биохимическом действии апокаротиноидов шафрана при коронавирусной инфекции.

Список литературы

1. Gholami M., Nozarnezhad R., Motaghinejad M. Hypothetical Protective Effect of Crocin Carotenoid against Coronavirus-Induced Organ Damage: The Possible Role of the NF- κ B Signaling Pathway // *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2021. № 46(3). P. 228–229. DOI: 10.30476/ijms.2021.88513.1921.

2. Hriday Sh.M., Ashvi J.S., Joshi Sh.V., Kharkar P.S.. Crocetin and related oxygen-enhancing compounds: Review of chemical synthesis, pharmacology, clinical development, and therapeutic applications // *Drug Development and Research*. 2021. P. 1–13. DOI: 10.1002/ddr.21814.

3. Дадали В.А., Соколова Е.А., Степанова Н.П. Апокаротиноиды растений. Некоторые аспекты биохимического действия // *Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Санкт-Петербург, 2–3 декабря 2021 г.* СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2021. С. 70–78.

4. Hadizadeh F., Mohajeri S.A., Seifi M. Extraction and Purification of Crocin from Saffron Stigmas Employing a Simple and Efficient Crystallization Method // *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2010. № 13(14). P. 691–698.

5. Lozano P., Castellar M.R., Simancas M.J., Iborra J.L. Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) product // *Journal of Chromatography A*. № 830 (1999). P. 477–483.

6. Kyriakoudi A., Chrysanthou A., Mantzouridou F., Tsimidou M.Z. Revisiting extraction of bioactive apocarotenoids from *Crocus sativus* L. dry stigmas (saffron) // *Analytica Chimica Acta*. 2012. № 755. P. 77–85.

7. Zeinali M, Zirak M.R., Rezaee S.A., Karimi G.H.R., Hosseinzadeh H. Immunoregulatory and anti-inflammatory properties of *Crocus sativus* (Saffron) and its main active constituents: A review // *Iranian Journal of Medi-*

cal Sciences. 2019. № 22. P. 334–344. DOI: 10.22038/ijbms.2019.34365.8158.

8. Mentis A-F.A., Dalamaga M., Lu C., Polissiou M.G. Saffron for «toning down» COVID-19-related cytokine storm: hype or hope? A mini-review of current evidence // *Metabolism Open*. 2021. № 11. P. 100–111.

9. Kordzadeh A., Saadatabadi A.R., Hadi A. Investigation on penetration of saffron components through lipid bilayer bound to spike protein of SARS-CoV-2 using steered molecular dynamics simulation // *Heliyon*. 2020. № 6(12). e05681; doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05681.

10. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S-C. Nk-kB signaling // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017. № 2, e17023; doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.

УДК 54.062:543.4

Дребенкова И.В., Кузовкова А.А.

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
Минск, Республика Беларусь
zav_lsi@rspch.by*

**МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ
ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В МОДЕЛЬНЫХ СРЕДАХ,
ИМИТИРУЮЩИХ ПИЩЕВУЮ ПРОДУКЦИЮ,
КОНТАКТИРУЮЩУЮ С УПАКОВКОЙ**

На основе атомно-эмиссионной спектроскопии разработана методика измерений массовых концентраций молибдена, никеля, цинка, меди и хрома в модельных средах, имитирующих пищевую продукцию, контактирующую с упаковкой, с пределом повторяемости до 9,2% и расширенной неопределенностью до 26,3% для каждого элемента в каждой модельной среде.

Ключевые слова: *методика измерений, атомно-эмиссионная спектроскопия, токсичные элементы, модельная среда, упаковка.*

Drebenkova I.V., Kuzovkova A.A.

*Republican unitary enterprise «Scientific practical centre of hygiene»,
Minsk, Belarus*

MEASUREMENT TECHNIQUE OF TOXIC ELEMENTS MASS CONCENTRATION IN MODEL MEDIA IMITATING FOOD PRODUCTS IN CONTACT WITH PACKAGE

Measurement technique of molybdenum, nickel, zinc, copper and chromium mass concentrations in model media imitating food products in contact with package with a repeatability limit up to 9,2% and an expanded uncertainty up to 26,3% for each element in each model medium has been developed based on atomic emission spectrometry.

Keywords: *measurement technique, toxic elements, model media, package, atomic emission spectrometry.*

В технологическом процессе производства упаковки из полимерных материалов используют различные добавки (стабилизаторы, пластификаторы, антипирены), которые могут содержать токсичные элементы и наносить вред здоровью человека [1]. Критериями оценки безопасности упаковки являются определение содержания в ней токсичных элементов, а также уровней их миграции в модельные среды, имитирующие пищевые продукты, контактирующие с упаковкой.

Уровни миграции токсичных элементов из упаковки регламентируются Техническим регламентом Таможенного Союза 005/2011 «О безопасности упаковки», который действует на территории стран Евразийского экономического союза [2]. Однако в Перечне стандартов к данному документу отсутствуют прямые методы определения уровней миграции токсичных элементов из упаковки в модельные среды. Предлагается использовать стандарты для питьевой воды, в частности, ГОСТ 31870-2012 «Вода питьевая. Определение содержания элементов методами атомной спектроскопии» [3].

Исходя из вышеизложенного, разработка метода измерений, позволяющего определять уровни миграции токсичных химических элементов из упаковки в модельные среды, имитирующие пищевую продукцию, актуальна.

Цель данной работы — разработать методику измерений массовых концентраций токсичных элементов (цинк (Zn), хром (Cr), медь (Cu), никель (Ni), молибден (Mo)) в модельных средах, имитирующих пищевую продукцию, контактирующую с упаковкой.

Объекты исследований — модельные пробы на основе органических кислот, имитирующие вытяжки из упаковки:

- 1) пробы 3% молочной кислоты;
- 2) пробы 3% уксусной кислоты;
- 3) пробы 2% лимонной кислоты, содержащие Mo в концентрации $0,1-1,0 \text{ мг/дм}^3$, Ni — $0,05-0,5 \text{ мг/дм}^3$, Zn $0,5-5,0 \text{ мг/дм}^3$, Cu — $0,5-5,0 \text{ мг/дм}^3$, Cr — $0,05-0,4 \text{ мг/дм}^3$.

Элементный анализ проводили на эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой (далее — АЭС-ИСП) Ultima-2 (Horiba Jobin Yvon, Франция), оснащенном пневматическим распылителем. Метод основан на измерении интенсивности излучения атомами определяемых токсичных химических элементов, возникающего при распылении анализируемой пробы в аргоновую плазму, индуктивно возбуждаемую радиочастотным электромагнитным полем.

Для установления оптимальных параметров анализа концентрации Zn, Cr, Cu, Ni, Mo в модельных средах, имитирующих пищевую продукцию, контактирующую с упаковкой, для каждого из исследуемых элементов протестированы от 2 до 4 специфичных длин волн детекции. При выборе линий были учтены такие параметры как требуемая чувствительность, отсутствие наложения, тип линии. В итоге, оптимальными длинами волн детекции для токсичных химических элементов в модельных средах, имитирующих пищевую продукцию, контактирующую с упаковкой, явились следующие: Mo — 202,030 нм, Ni — 221,647 нм, Zn — 213,856 нм, Cu — 324,754 нм, Cr — 267,716 нм.

Выбор мощности генератора АЭС-ИСП Ultima-2 Horiba JY зависит от исследуемой матрицы. Так как исследуемые пробы представляют собой растворы органических кислот, то для уменьшения любых возможных матричных эффектов мощность генератора была повышена с 1000 Вт (для водных растворов) до 1100 Вт. Для всех 5 исследуемых токсичных элементов при проведении оценки их концентраций в модельных средах, имитирующих пищевую продукцию, использовали слабый поток оболочечного газа со скоростью $0,2 \text{ дм}^3/\text{мин}$, так как повышение этого значения привело бы к потере чувствительности.

Таким образом, оптимальные параметры работы АЭС-ИСП Ultima-2 Horiba JY были следующими: мощность генератора — 1100 Вт; скорость потока газа плазмы — $12 \text{ дм}^3/\text{мин}$; скорость потока газа в оболочке — $0,2 \text{ дм}^3/\text{мин}$; скорость потока вспомогательного газа — $0 \text{ дм}^3/\text{мин}$; скорость распыления — $0,8 \text{ дм}^3/\text{мин}$ при 2,82 бар; скорость подачи пробы — $1,2 \text{ см}^3/\text{мин}$. При заданных параметрах работы спектрометра пределы количественного определения массовых концентраций исследуемых элементов в 2% лимонной кислоте составляли: для Mo — $0,0053 \text{ мг/дм}^3$; для Ni — $0,0034 \text{ мг/дм}^3$; для Zn — $0,0064 \text{ мг/дм}^3$; для Cu — $0,0048 \text{ мг/дм}^3$; для Cr — $0,0020 \text{ мг/дм}^3$, в 3% молочной кислоте для

Mo — 0,0054 мг/дм³; для Ni — 0,0055 мг/дм³; для Zn — 0,0017 мг/дм³; для Cu — 0,0076 мг/дм³; для Cr — 0,0017 мг/дм³; в 3% уксусной кислоте для Mo — 0,0072 мг/дм³; для Ni — 0,0031 мг/дм³; для Zn — 0,0048 мг/дм³; для Cu — 0,0076 мг/дм³; для Cr — 0,0024 мг/дм³.

На основе вышеуказанных условий спектрометрического анализа разработана методика измерений массовых концентраций Mo, Ni, Zn, Cu и Cr в модельных средах, имитирующих пищевую продукцию, контактирующую с упаковкой. Диапазоны измерений массовых концентраций токсичных элементов в модельных средах, имитирующих пищевую продукцию, контактирующую с упаковкой, включают установленные в ТР ТС 005/2011 [2] и Гигиеническом нормативе [4] значения минимально допустимых количеств миграции (ДКМ) из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами: ДКМ для Zn — 1,0 мг/дм³; ДКМ для Cr — 0,1 мг/дм³; ДКМ для Cu — 1,0 мг/дм³; ДКМ для Mo — 0,25 мг/дм³; ДКМ для Ni — 0,1 мг/дм³. Диапазоны массовых концентраций, а также пределы повторяемости, пределы промежуточной прецизионности и относительные расширенные неопределенности для каждого из элемента приведены в табл. 1.

Установлено, что для исследуемых элементов в 2% лимонной кислоте предел повторяемости составляет от 4,6% до 9,2%, предел промежуточной прецизионности — от 4,3% до 17,4%, относительная расширенная неопределенность — от 15,5% до 24,8%; в 3% молочной кислоте предел повторяемости составляет от 5,2% до 8,5%, предел промежуточной прецизионности — от 6,8% до 16,0%, относительная расширенная неопределенность — от 17,6% до 26,3%; в 3% уксусной кислоте предел повторяемости составляет от 3,7% до 7,9%, предел промежуточной прецизионности — от 6,9% до 11,6%, относительная расширенная неопределенность — от 17,3% до 21,5%.

Таким образом, разработана методика измерений уровней миграции Mo, Ni, Zn, Cu и Cr из упаковки в модельные среды, имитирующие пищевую продукцию, контактирующую с упаковкой. Применение методики позволит повысить качество и эффективность контроля безопасности упаковки для пищевых продуктов.

Таблица 1. Метрологические характеристики методики измерений массовых концентраций Mo, Ni, Zn, Cu и Cr в модельных средах, имитирующих пищевую продукцию, контактирующую с упаковкой

Токсичный элемент	Массовая концентрация элемента, мг/дм ³	Предел повторяемости г, %	Предел промежуточной прецизионности г К(ТО), %	Относительная расширенная неопределенность U, %
2% лимонная кислота				
Mo	От 0,1 до 1,0	5,3	4,3	18,3
Ni	От 0,05 до 0,5	9,2	17,4	24,8
Zn	От 0,5 до 5,0	5,3	4,3	18,5
Cr	От 0,05 до 0,4	6,0	7,4	15,0
Cu	От 0,5 до 5,0	4,6	6,7	19,5
3% молочная кислота				
Mo	От 0,1 до 1,0	5,2	6,8	26,3
Ni	От 0,05 до 0,5	8,5	16,0	26,3
Zn	От 0,5 до 5,0	7,1	7,2	20,0
Cr	От 0,05 до 0,4	5,2	8,9	24,2
Cu	От 0,5 до 5,0	5,3	6,8	17,6
3% уксусная кислота				
Mo	От 0,1 до 1,0	7,9	10,8	17,3
Ni	От 0,05 до 0,5	4,9	7,0	21,5
Zn	От 0,5 до 5,0	5,9	11,6	17,8
Cr	От 0,05 до 0,4	4,9	6,9	18,7
Cu	От 0,5 до 5,0	3,7	7,9	17,5

Исследования выполнены в рамках задания 04.06 «Разработать и научно обосновать метод гигиенической оценки упаковки и материалов, контактирующих с пищевой продукцией, включая биоразлагаемые» ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг».

Список литературы

1. Токсичные добавки в пластике и многооборотная экономика. URL: https://ipen.org/sites/default/files/documents/plastics_and_additives_-_v1-o-ru.pdf. (дата обращения: 07.09.2022).
2. О безопасности упаковки: ТР ТС 005/2011: принят 16.08.2011: вступ. в силу 01.07.2012. Минск: Госстандарт, 2017. 36 с.
3. Вода питьевая. Определение содержания элементов методами атомной спектроскопии: ГОСТ 31870-2012. М.: Стандартинформ, 2013. 23 с.

4. Требования к миграции веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами: гигиен. норматив: утв. Постановлением М-ва здравоохранения Респ. Беларусь 30.12.2014. № 119. Минск, 2014. 18 с.

УДК 541.57

Елисейев С.Ю.

*Белорусский государственный педагогический университет
имени Максима Танка,
Минск, Беларусь
syeliseyev@yandex.ru*

ГИПЕРВАЛЕНТНОСТЬ — СТРОЕНИЕ ДИОКСИДА АЗОТА

Рассмотрена возможность применения варианта метода молекулярных орбиталей — теории гипервалентных связей (ГВС) для строения молекулы диоксида азота.

Ключевые слова: *многоцентровая связь, гипервалентные связи, несвязывающие орбитали, порядок связи.*

Yeliseyev S.Yu.

*Maxim Tank Belarusian State Pedagogical University,
Minsk, Belarus
syeliseyev@yandex.ru*

HYPERVALENCE — THE STRUCTURE OF NITROGEN DIOXIDE

The article considers the possibility of using a variant of the method of molecular orbitals — the theory of hypervalent bonds (GWS) for the structure of a nitrogen dioxide molecule.

Keywords: *multicenter coupling, hypervalent coupling, non-binding orbitals, coupling order.*

Теория химической связи — основа в изучении курса неорганической химии, органической химии, как в школе, так и в высших учебных заведениях. В настоящее время и в средней школе, и в высшей школе (на нехимических факультетах) рассматривают такие типы химической связи: ковалентную, ионную, металлическую, водородную [1, с. 42]. Это связано с различным характером распределения электронной плотности в системах взаимодействующих атомов. Но все они в значительной мере используют основные понятия ковалентной связи (CV).

Ковалентная связь может быть описана различными методами. Чаще всего используют метод валентных связей (МВС). Основная идея МВС заключается в предположении, что два атома, при взаимодей-

вии друг с другом, объединяют свои неспаренные электроны, или неподеленную электронную пару одного атома и свободную орбиталь другого, но атомные орбитали сохраняют при образовании молекулы известную индивидуальность. То есть обобществленная электронная плотность распределяется между двумя атомами. Это можно сформулировать иначе — образуется двуцентровая двухэлектронная связь — (2с–2е). (Иногда рассматривают обобществление *p*-электронов между определенным числом атомов, например, в молекуле бензола.) При этом система из связанных друг с другом атомов понижает свою потенциальную энергию, по сравнению с двумя (несколькими) разрозненными атомами.

Значительное число соединений образовано атомами, которые при образовании молекул удовлетворяют свою потребность в максимально возможном достижении 8-электронной валентной оболочки, подобной электронной конфигурации ближайшего благородного газа, за счет попарного обобществления своих валентных электронов [2, 1 т., с. 108–109]. Однако существует достаточно большое количество соединений, когда вокруг одного из атомов соединения может находиться больше чем 8 электронов (т.е. происходит нарушение так называемого правила октета). Чаще всего это относится к *p*-элементам 15-18 групп Периодической системы (SF_6 , PF_5 , ClF_5 , ClF_3 , ClF_7 , XeF_2 , XeF_4 , XeF_6 , XeF_8 , SO_2 , SO_3 , NO_2 и др.) И это вызывает затруднение в описании структуры подобных соединений.

МВС, наглядный и достаточно простой способ описания химической связи, но не всегда верно и полно описывает физические и химические свойства некоторых соединений — например, кислорода, ионов молекулярного водорода...

Другим способом описания ковалентной связи является метод Молекулярных Орбиталей (ММО). И в этом методе сохраняется основной принцип ковалентности — обобществление электронов [2, 1 т. с. 153]. Достоинство этого метода в том, что он более приспособлен к рассмотрению делокализации электронов между несколькими атомами. Необходимо отметить, что многоцентровая делокализация электронов рассматривается и в МВС («Теория резонанса»). Достаточно вспомнить пример делокализации в нитрат ионе, сульфат ионе или не гибридных электронов *p*-орбиталей атомов углерода в молекуле бензола — (6с–6е) [3].

ММО, возникнув практически одновременно с МВС, не противоречит ему. ММО продемонстрировал большие возможности определения структуры молекул. Но, при этом он более сложный и менее наглядный. Тем не менее, его основы входят в курс химии любого вуза.

Нахождение молекулярных орбиталей — областей с высокой электронной плотностью — является целью ММО. Если перекрывание атомных орбиталей (АО) происходит по оси проходящей через атомные ядра, то образующаяся молекулярная орбиталь будет называться σ -орбиталью и возникает σ -связь. Возможно образование π -орбиталей и соответственно — π -связей, (перекрывание АО в плоскости, проходящей через центры атомных ядер) и δ -орбиталей с образованием δ -связей (взаимодействие $d-d$ АО в плоскости перпендикулярной оси соединяющей ядра взаимодействующих атомов всех четырех лепестков обоих d -орбиталей) [4, с. 5].

– Перекрываться могут близкие по энергии орбитали.

– Молекулярная орбиталь образуется только при взаимном перекрывании соответствующих орбиталей подходящей симметрии.

Если при образовании молекулярной орбитали взаимодействие волновых функций совпадает по фазе, то электроны, занимающие эту орбиталь, связывают ядра атомов и такая молекулярная орбиталь называется связывающей МО ($\sigma_{св.}$ или $\pi_{св.}$). Заселение связывающей МО электронами приводит к понижению энергии молекулы и повышению ее устойчивости.

В тех областях пространства, где волновые функции атомов находятся в противофазе, образуются разрыхляющие (несвязывающие) молекулярные орбитали ($\sigma_{св.}$ или $\pi_{св.}$). Эти орбитали не понижают энергию взаимодействующих атомов и нахождение на них электронов не способствуют возрастанию стабильности сближающихся атомов [4, с. 8, 5, с. 80].

Число образующихся молекулярных орбиталей равно числу взаимодействующих атомных орбиталей. Взаимодействие двух АО приводит к образованию двух молекулярных орбиталей, одна из которых *связывающая*, вторая — *разрыхляющая*.

Заполнение образующихся молекулярных орбиталей происходит аналогично заполнению атомных орбиталей в соответствии с принципом наименьшей энергии системы, принципом Паули и правилом Хунда.

Изложением данных принципов чаще всего и ограничиваются. Но если сделать небольшой шаг вперед и несколько углубить изложение теории, можно сделать огромный шаг в понимании строения, а соответственно свойств, огромного числа соединений. Для этого надо ввести понятие *гипервалентных* связей (ГВС).

Надо отметить, что подход к формированию многоцентровых молекулярных орбиталей, учитывающих делокализацию электронной

плотности между атомами в методе МО, отличается от делокализации в методе валентных связей (ВС) [4, с. 51, 5, с. 218].

В методе ГВС различают следующие взаимодействия, приводящие к образованию соединений непременными элементами:

– ковалентные двухцентровые двухэлектронные химические связи (CV) (**2c-2e**), возникающие при взаимодействии занятой неспаренными электронами валентных *s*- или *p*-орбиталей центрального атома (А) с занятой неспаренными электронами валентных *s*- или *p*-орбиталей другого атома (Х), при этом образуется заполненная электронами σ -связывающая и свободная от электронов σ^N -разрыхляющая МО. Такие химические связи А-Х характеризуются единичной кратностью, достаточно высокой энергией связи и являются устойчивыми;

– гипервалентная орбитально-избыточная (OS) двухэлектронная трехцентровая связь (**3c-2e**) образуется за счет неспаренного электрона валентной орбитали центрального атома, взаимодействующего одновременно с двумя валентными орбиталями двух других атомов, одна из которых занята неспаренным электроном, а другая свободна от электронов. То есть образующаяся электронная пара распределена по орбиталям трех атомов [4, с. 54; 5, с. 103].

При этом образуются трехцентровые *связывающая* и *разрыхляющая* МО, а также *несвязывающая* МО, локализованная на концевых атомах. Поскольку электронами занята только связывающая орбиталь, наблюдается общий выигрыш в энергетическом состоянии системы из нескольких атомов;

– гипервалентные (HV) трехцентровые четырехэлектронные связи (*орбитально-дефицитные*) (**3c-4e**), в каждой из которых электронная пара, находящаяся на *p*- или *s*-орбитали центрального атома (А), взаимодействует с двумя валентными орбиталями атомов ($X_{1,2}$), имеющими по одному электрону. При этом образуются трехцентровые σ - или π -связывающая и σ^N - или π^N -разрыхляющая МО, а также σ - или π -несвязывающая МО, локализованная на концевых атомах-(лигандах) (обычно это атомы с большей электроотрицательностью). Электронами заняты связывающая орбиталь, и несвязывающая МО. Разрыхляющая МО свободна. И в этом случае наблюдается общий выигрыш в энергетическом состоянии системы из трех атомов.

В зависимости от того *p*- или *s*-орбиталь центрального атома участвует в образовании гипервалентной связи, различают гипервалентные-1 (HV-1 — ClF₃, XeF₂, XF₄ и т.п.) и гипервалентные-2 (HV-2 — IF₇, SF₆, PF₅ и т.п.) связи соответственно. Трехцентровые МО связей HV-1

линейных фрагментов X-A-X направлены вдоль соответствующих осей координат почти под прямым углом.

В HV-2 участие ns -орбиталей центрального атома А в высшей степени окисления обеспечивает наиболее симметричную геометрию молекулы. За счет большего экранирования внутренними слоями валентных s -электронов центрального атома по сравнению с p -электронами, связи HV-2 являются достаточно прочными [6, с. 132].

Приведенные сведения могут помочь рассмотреть строение трехатомной молекулы NO₂, вызывающей определенную сложность в понимании ее строения [1, с. 363].

Рассмотрим строение молекулы NO₂, учитывая, что в ее образовании принимают участие $2s$, $2p_x$, $2p_y$, $2p_z$ -орбитали атома азота и $2p_x$, $2p_y$, $2p_z$ -орбитали двух атомов кислорода, а также, примем во внимание, что разница между энергиями $2s$, $2p$ у азота меньше (1196 кДж/моль), чем у кислорода (1592 кДж/моль) [4, с. 24–25].

Если рассмотреть энергетическую диаграмму образования молекулы NO₂ по методу МО ЛКАО, то необходимо учесть, что наблюдаются значительные различия в энергии между $1s$, $2s$ и $2p$ -орбиталями у атома кислорода, у атома азота они значительно меньше [4, с. 24–25, 5, с. 114]. Каждый атом кислорода имеет восемь электронов. Электроны $1s$ и $2s$ уровней атомов кислорода практически не принимают участия в образовании молекулярных орбиталей и не дают вклада в связь (орбитали $1s$ не изображены на схеме рис. 1). У атома азота также не показаны электроны $1s$ уровня. Распределение остальных валентных электронов двух атомов кислорода и атома азота видим на диаграмме (рис. 1): $\sigma_{св.1}$ и $\sigma_{св.2}$ ($2с-2е$) содержат четыре электрона. На гипервалентной трехцентровой π -связи ($3с-3е$) $\pi_{св.}$, $\pi_{несв.}$ и $\pi_{разр.}$ -связи находится три электрона. Заполнена $\pi_{св.}$ - и частично $\pi_{несв.}$ -орбитали. Поскольку разрыхляющая орбиталь не заполнена, наблюдается выигрыш энергии. Молекула достаточно устойчива ($T_{пл.} -11\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{кип.} 21\text{ }^{\circ}\text{C}$) [1, с. 362].

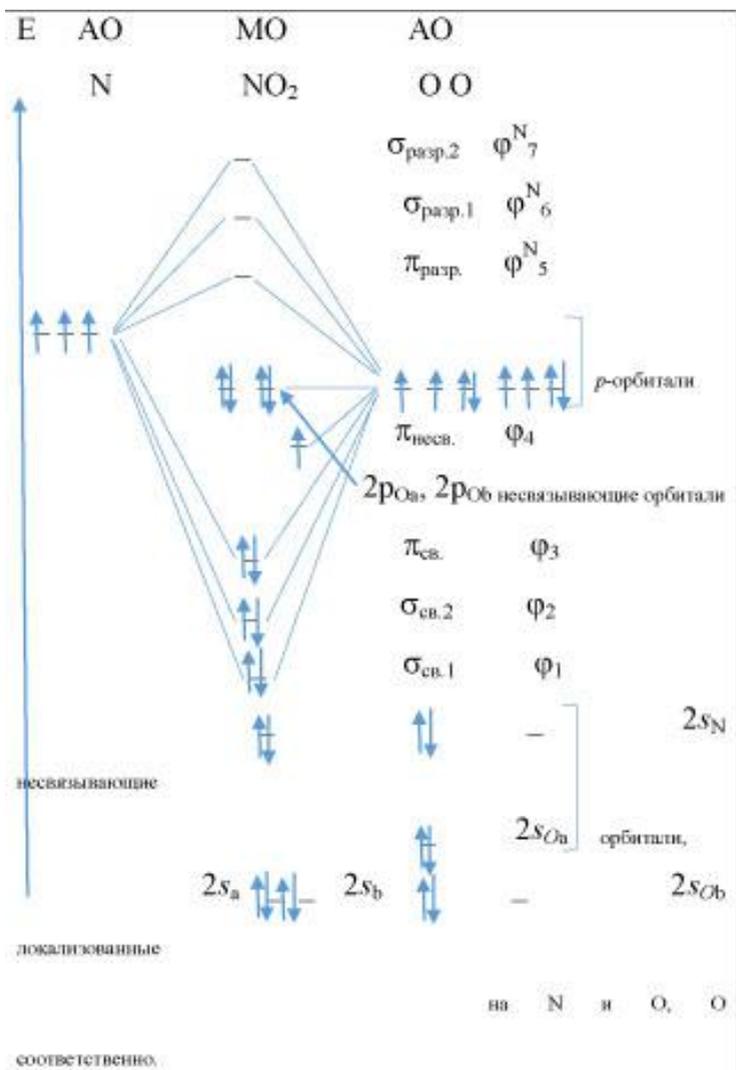


Рис. 1. Энергетическая диаграмма образования молекулы NO_2 .

Между атомом азота и атомами кислорода образуются две σ -связи и одна трехцентровая трехэлектронная связь — гипервалентная (HV-1). От атома азота в образовании связей в молекуле NO_2 принимают участие три валентных p -электрона, от атомов кислорода 4 неспаренных p -электрона

На двух связывающих орбиталях φ_1, φ_2 (φ^1)-двухцентровых находится четыре электрона, они дают вклад в порядок связи между атомами по 1 каждая. φ_3 -Связывающая $\pi_{св.}$ -орбиталь. На φ_4 -несвязывающей орбитали тройной связи находится неспаренный электрон. Вклад трехцентрорной связи в порядок связи, с учетом двух электронов на $\pi_{св.}$ (φ_3) $2/3=0,66$. Общий порядок связи в молекуле NO_2 близок к 1,5.

Несвязывающие орбитали не оказывают значительного влияния на энергию образования молекулы, соответственно не вносят принципиального вклада во взаимодействие атомов и локализованы на исходных атомах. Многоцентровые несвязывающие орбитали локализованы, чаще всего, на более электроотрицательных атомах [4, с. 57].

Электронная конфигурация NO_2 — $(2s_{\text{N}})^2(2s_{\text{a}})^2(2s_{\text{b}})^2(\sigma_{св.1})^2(\sigma_{св.2})^2(\pi_{св.})^2(\pi_{несв.})^1$. Наличие электрона на φ_4^{N} ($\pi_{несв.}$) определяет парамагнитные свойства NO_2 [1, с. 363].

Использование модификации ММО — метода гипервалентных связей (ГВС) может значительно улучшить понимание студентами электронного строения большого числа молекул и соответственно четче представлять их химические и физические свойства. Позволяет более наглядно и доступно применять общие принципы ММО в объяснении свойств множества как хорошо знакомых, так и вновь открываемых веществ. В качестве индикатора необходимости применения ГВС может служить простой подсчет количества электронов в окружении атома. Наличие в окружении атома более восьми электронов (нарушение правила октета) является четким признаком участия данного атома в многоцентровых связях.

Список литературы

1. Ахметов Н.С. Общая и неорганическая химия. 4-е изд. М.: Высшая школа. Изд. центр «Академия», 2001. 743 с.
2. Шрайвер Д., Эткинс П. Неорганическая химия. В 2 т. М.: Мир, 2004.
3. Елисеев С.Ю. Многоцентровые ковалентные связи // Біялогія і Хімія. Мн. 2018. № 8. С. 55–59.
4. Волков А.И. Метод молекулярных орбиталей. М.: Новое знание, 2006. 132 с.
5. Пиментел Г., Спратли Р. Как квантовая механика объясняет химическую связь. М.: Мир, 1973. 332 с.

¹ Буква φ используется только для удобства перечисления связей в электронной конфигурации молекулы.

6. Корольков Д.В., Скоробогатов Г.А. Основы теоретической химии. 2004: учебное пособие для вузов. М.: Академия, 2004. 348 с.

УДК 544.77.022.532

Ермишина Е.Ю.

*ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России,
Екатеринбург, Россия
ermishina.e.yu@mail.ru*

ДИФФУЗИЯ ИОНОВ НАТРИЯ ЧЕРЕЗ ПОЛУПРОНИЦАЕМУЮ МЕМБРАНУ НА ПРИМЕРЕ РАСТВОРОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОГО БАЛАНСА

Рассчитаны коэффициенты проницаемости ионов натрия в процессе простой диффузии через полупроницаемую мембрану для кристаллоидных растворов для инфузий. Растворы Рингера имеют среднее значение коэффициента проницаемости — $0,49 \pm 0,31$ нм/с, растворы, содержащих только однозарядные ионы — $1,96 \pm 0,45$ нм/с.

Ключевые слова: *растворы Рингера, диффузия, ион натрия, коэффициент проницаемости, полупроницаемая мембрана.*

Ermishina E.Y.

*Ural State Medical University,
Ekaterinburg, Russia*

DIFFUSION OF SODIUM IONS THROUGH A SEMIPERMEABLE MEMBRANE ON THE EXAMPLE OF SOLUTIONS FOR THE CORRECTION OF WATER AND ELECTROLYTE BALANCE

Permeability coefficients of sodium ions in the process of simple diffusion through a semipermeable membrane for crystalloid infusion solutions are calculated. Ringer's solutions have an average value of the permeability coefficient — 0.49 ± 0.31 nm/s, solutions containing only singly charged ions — 1.96 ± 0.45 nm/s.

Keywords: *Ringer's solutions, diffusion, sodium ion, permeability coefficient, semipermeable membrane.*

Введение. В группу регуляторов водно-солевого и кислотно-основного состояния объединяют различные кристаллоидные растворы, позволяющие осуществить коррекцию электролитного и кислотно-основного состава крови при лечении острой кровопотери и обезвоживания организма [1]. Полиионные растворы: дисоль, лактасол, трисоль,

хлосоль и др., растворы Рингера, Рингер-лактат и Рингера–Локка, наряду с хлоридом натрия содержат и другие жизненно важные электролиты. Состав и применение жидкостей для внутривенной инфузионной терапии должны диктоваться только целевым пространством, требующим восполнения или коррекции. Дифференцированная внутривенная инфузионная терапия обычно направлена на внутрисосудистый объем, либо на внеклеточный объем. Объемное замещение восполняет потери внутрисосудистой жидкости и корректирует гиповолемию с целью поддержания гемодинамических показателей организма на нормальном уровне [2]. Это осуществляется за счет физиологического раствора, содержащего как коллоидно-осмотические, так и осмотические компоненты, т.е. жидкости, одновременно изоонкотические и изотонические [1]. В процессе инфузионной терапии возможно избыточное поступление ионов натрия, приводящее к гипернатриемии. Известно, что ион натрия — основной катион внеклеточной жидкости и содержание данного иона в клетках организма не должно превышать 12 ммоль/л [3]. Тем не менее в процессе коррекции нарушений гидроионного и кислотно-основного баланса возможно дополнительное поступление ионов натрия в клетку. Представляет интерес оценить способность натрия проникать через полупроницаемую мембрану из модельных растворов для инфузий в процессе простой диффузии.

Цель работы: оценить коэффициенты проницаемости ионов натрия через полупроницаемую мембрану на примере модельных растворов для инфузий, использующихся для коррекции водно-электролитного баланса.

Материалы и методы исследования. Для диффузии использовалась специальная установка с мембранным фильтром из ацетата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм [4]. Для оценки скорости диффузии были приготовлены растворы, используемые для регуляции водно-водно-солевого и кислотно-основного состояния (см. таблицу 1). Для приготовления модельных растворов были использованы хлорид натрия, хлорид калия, гидрокарбонат натрия, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид кальция, хлорид магния марки о.с.ч., дистиллированная вода. 100 мл приготовленного раствора для инфузий помещали во внешний сосуд установки для диффузии. Во внутренний сосуд заливали дистиллированную воду. После 40 мин работы установки определялось содержание ионов натрия во внутреннем сосуде. Концентрация ионов натрия определена потенциометрическим методом с помощью ионоселективного электрода (иономер «Анион 4100»). Статистическая обработка результатов исследования выполнена при достоверности ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Растворы, взятые для исследования, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Содержание ионов натрия в корректорах водно-электролитного баланса до диффузии (по литературным данным [1]), во внутреннем сосуде после диффузии и коэффициент проницаемости через мембрану из ацетата целлюлозы

Раствор и его ионный состав	C_{Na^+} ммоль/л по данным литературы	C_{Na^+} ммоль/л во внутреннем сосуде установки для диффузии	Коэффициент проницаемости P , нм/с
Квартосоль: Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , CH_3COO^-	140	11,22±0,03	1,77±0,01
Дисоль: Na^+ , Cl^- , CH_3COO^-	127	9,55±0,03	1,65±0,01
Трисоль: Na^+ , Cl^- , HCO_3^-	97	10,96±0,03	2,59±0,01
Ацесоль: Na^+ , Cl^- , CH_3COO^-	110	9,80±0,03	1,98±0,01
Хлосоль: Na^+ , Cl^- , CH_3COO^-	124	10,05±0,03	1,79±0,01
Рингера –локка: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}	131	3,04±0,03	0,48±0,01
Рингер-лактат: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , лактат-ион	130	1,37±0,03	0,24±0,01
Рингера: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}	140	5,27±0,03	0,79±0,01
Рингер-лактат с магнием: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , лактат-ион	139,5	5,12±0,03	0,48±0,01

В установке, используемой в опыте, перенос ионов натрия осуществляется за счет простой диффузии. Процесс диффузии контролировался по изменению содержания ионов натрия во внутреннем и внешнем сосуде. Измеренная концентрация ионов натрия во внутреннем сосуде по окончании эксперимента для всех растворов представлена в табл. 1. Могут быть две причины переноса вещества при простой диффузии: градиент концентрации dC/dx и градиент электростатического

потенциала $d\psi/dx$ [4,5]. Градиент электростатического потенциала в расчетах не учитывался. Для описания явлений переноса через биологические мембраны используется уравнение Коллендера–Бернульда $dm/dt = -PS(C_1 - C_2)$, где P — коэффициент проницаемости, аналогичен коэффициенту диффузии, но в отличие от него зависит не только от температуры и природы вещества, но еще и от свойств мембраны и ее функционального состояния; C_1 и C_2 — концентрации по разные стороны мембраны [5]. Площадь мембраны составляла $S = 6,15 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2$. Из уравнения Коллендера–Бернульда были посчитаны коэффициенты проницаемости ионов натрия через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы.

Явления диффузии с участием данного фильтра удовлетворительно описывают процессы диффузии через полупроницаемые мембраны [4]. Коэффициенты проницаемости ионов натрия для растворов Рингера, содержащие двухзарядные ионы кальция и магния имеют среднее значение коэффициента проницаемости $0,49 \pm 0,31 \text{ нм/с}$, что на порядок меньше коэффициентов проницаемости для ионов натрия из растворов, содержащих только однозарядные ионы: $1,96 \pm 0,45 \text{ нм/с}$.

Выводы.

1. В рамках использования модельных полиионных растворов для инфузионной терапии изучены явления пассивного транспорта ионов натрия через полупроницаемую мембрану из ацетата целлюлозы.

2. Вычислены коэффициенты проницаемости ионов натрия через модельную мембрану. Небольшая величина коэффициентов проницаемости ионов натрия через модельную мембрану свидетельствует о том, что проникновение ионов натрия во внутриклеточное пространство в процессе инфузионной терапии происходит в незначительной степени.

3. Наименьшие коэффициенты проницаемости имеют растворы Рингера, содержащие ионы кальция и магния, наиболее сбалансированные по электролитному составу.

Список литературы

1. Прасмыцкий О.Т., Ржеутская Р.Е. Инфузионная терапия: учебно-методическое пособие. Минск: БГМУ, 2011. 64 с.

2. Гаймоленко И.Н., Мироманова Н.А. Особенности инфузионной терапии в педиатрии: учебное пособие для студентов. Чита: РИЦ ГБОУ ВПО ЧГМА, 2016. 38 с.

3. Курек В.В., Кулагин А.Е. Анестезиология и интенсивная терапия детского возраста: практическое руководство. М.: Изд-во Медицинское информационное агентство, 2011. 992 с.

4. Белоконова Н.А., Ермишина Е.Ю., Наронова Н.А., Бородулина Т.В. Диффузия минерального состава молочных смесей через полупроницаемую мембрану в сравнении с грудным молоком и модельным раствором // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. № 1(24). С. 115–121.

5. Ермишина Е.Ю., Белоконова Н.А., Наронова Н.А., Бородулина Т.В. Определение коэффициентов диффузии и размеров частиц в восстановленных молочных смесях // Успехи современного естествознания. 2018. № 4. С. 23–28.

УДК 544.08

Ермишина Е.Ю., Еловицова Т.М.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Минздрава России,

Екатеринбург, Россия

ermishina.e.yu@mail.ru

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ СРЕДСТВ ГИГИЕНЫ

Потенциометрическим методом определено содержание ионов фтора в смешанной слюне добровольцев после использования двух ополаскивателей и зубной пасты для чувствительных зубов, содержащих фторид натрия. Применение зубной пасты дает значительный десенситивный эффект, применение ополаскивателей практически не изменяет нормальное содержание фтора в смешанной слюне.

Ключевые слова: *зубная паста, фторид-ион, ополаскиватели, потенциометрический метод.*

Ermishina E.Y., Elovikova T.M.

Ural State Medical University,

Ekaterinburg, Russia

CHANGES IN THE PHYSICAL AND CHEMICAL PARAMETERS OF THE ORAL FLUID UNDER THE INFLUENCE OF FLUORINE- CONTAINING HYGIENE PRODUCTS

The content of fluoride ions in the mixed saliva of volunteers was determined by the potentiometric method after the use of two rinses and toothpaste for sensitive teeth containing sodium fluoride. The use of toothpaste gives a significant desensitizing effect, the use of rinses practically does not change the normal fluorine content in mixed saliva.

Keywords: *toothpaste, fluoride ion, rinses, potentiometric method.*

Введение. Фтор является необходимым для человеческого организма микроэлементом. Взаимодействуя с гидроксиапатитом, фтор не дает развиваться кариесу, укрепляя зубную эмаль [1, 3–5]. Избыток фтора приводит к тому, что процессы обмена веществ замедляются, ухудшается здоровье зубной эмали. Основным путем поступления соединений фтора через ЖКТ с водой и пищей. Использование зубных паст и ополаскивателей с соединениями фтора также может служить источником его поступления в организм, так как при чистке зубов создается избыточная концентрация ионов фтора в полости рта [1–5].

Цель работы: анализ концентрации ионов фтора в составе ротовой жидкости при использовании зубной пасты и ополаскивателей с фторидом натрия.

Материалы и методы исследования. Для проведения эксперимента была сформирована группа пробандов обоего пола в количестве 14 человек — студентов первого курса стоматологического факультета в возрасте 18–19 лет. У пробандов после чистки зубов зубной пастой (ЗП) для чувствительных зубов или ополаскивателя (ОП1) с аквакомплексом глицеросольвата титана (АКГТ) и без него (ОП2), содержащих фторид натрия, было взято 5 мл ротовой жидкости с целью определения концентрации ионов фтора в ней. Концентрация ионов фтора была определена потенциометрическим методом с помощью ионоселективного электрода (иономер «Анион 4100»).

Проведена статистическая обработка с использованием пакета прикладных программ EXCEL (версия 2007). Данные представлены в виде средних арифметических величин и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Для установления достоверности различий использовалось t -распределение Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Ополаскиватели ОП1 с АКГТ и ОП2 без него имели невысокое содержание фтора 100 ppm. Основная функция этих жидких средств гигиены — бактерицидное и гигиеническое воздействие, а не реминерализация зубной эмали. Зубная паста содержала 1450 ppm фтора, такой концентрации достаточно для предотвращения кариеса. Результаты определения содержания фторид-ионов в ротовой жидкости добровольцев представлены в табл. 1.

Таблица 1. Концентрация ионов фтора в смешанной слюне добровольцев после использования средств гигиены

Средство гигиены	Концентрация ионов фтора
ОП1 с АКГТ	1,31±0,05 мкмоль/л
ОП2	1,17±0,05 мкмоль/л
ЗП	3,04±0,05 мг/л
ЗП после недели использования	3,71±0,05 мг/л

Содержание ионов фтора, однократно определенное после использования ополаскивателя, было в пределах нормы по фтору в смешанной слюне 0,5–2,5 мкмоль/л [3]. Использование ополаскивателя с АКГТ создавало на 10,7% большую концентрацию фторид-ионов.

Использование фторсодержащей ЗП создавало значительную концентрацию ионов фтора 3,04±0,05 мг/л. Стоит помнить, что фториды ЗП не предотвращают кариес зубов, но, они могут обеспечить снижение его интенсивности, особенно в старших возрастных группах населения [4, 5]. Тем не менее сегодня использование фторидсодержащих ЗП — это самый практичный метод реализации программ массовой профилактики стоматологических заболеваний [3, 5]. Использование данной зубной пасты в течение недели привело к тому, что измеренное содержание фтора с смешанной слюне добровольцев после непосредственного применения увеличилось на 18%.

Выводы

1. Использование фторсодержащих ополаскивателей практически не изменяет содержание ионов фтора в смешанной слюне добровольцев по сравнению с нормой.

2. Оценка содержания фторид-ионов после чистки зубов исследуемой зубной пастой, показала, что ее применение создает значительный десенситивный эффект, так как содержание ионов фтора в слюне достоверно увеличивается.

Список литературы

1. Elovikova T.M., Ermishina E.Y., Koshcheev A.S. Analysis of the impact of therapeutic and prophylactic toothpaste containing bicarbonate and sodium fluoride on the state of the oral cavity in inflammatory periodontal diseases in young patients (clinical and laboratory research) // *Periodontology* 2000. 2019. Т. 1. С. 45.

2. Еловицова Т.М., Ермишина Е.Ю., Уварова Л.В., Кошчев А.С. Решение проблемы повышенной чувствительности дентина: механизмы реминерализации при курсовом использовании зубной пасты с фторидом олова // *Стоматология*. 2019. Т. 98. № 5. С. 66–71.

3. Еловикова Т.М., Ермишина Е.Ю., Михайкина Н.И. Механизмы восстановительного действия новой лечебно-профилактической зубной пасты // *Стоматология*. 2016. Т. 95. № 5. С. 32–35.

4. Замараева А.И., Попова М.И., Кобелева Т.А и др. Изучение диффузии новых титансодержащих комплексных препаратов некоторых производных 5-нитроимидазола и бета-адреноблокаторов на твердых и гелевых носителях // *Наукофера*. 2022. № 2(1). С. 1–6.

5. Михайкина Н.И. Сравнительная характеристика современных средств профилактики кариеса зубов // *Медицина и фармакология: современный взгляд на изучение актуальных проблем / Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции № 1*. Астрахань. 2016. С. 104–109.

УДК 544.08

Ермишина Е.Ю., Наронова Н.А.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Минздрава России,

Екатеринбург, Россия

ermishina.e.yu@mail.ru

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ КАЛИЯ И НАТРИЯ В МОЛОЧНЫХ СМЕСЯХ, ПРИГОТОВЛЕННЫХ НА РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ВОД

Потенциометрическим методом измерено содержание ионов калия и натрия в трех типах воды и порции молочной смеси для детей до года, приготовленной на этой воде. Содержание данных ионов соответствует концентрации, заявленной производителями в 100 мл готового продукта, и практически не зависит от типа используемой воды.

Ключевые слова: ионы натрия и калия, молочные смеси для детей до года, потенциометрический метод.

Ermishina E.Y., Naronova N.A.

Ural State Medical University,

Ekaterinburg, Russia

DETERMINATION OF THE CONTENT OF POTASSIUM AND SODIUM IONS IN MILK MIXTURES PREPARED ON VARIOUS TYPES OF WATER

The potentiometric method was used to measure the content of potassium and sodium ions in three types of water and a portion of milk

formula for children under one year old, prepared with this water. The content of these ions corresponds to the concentration declared by the manufacturers in 100 ml of the finished product, and practically does not depend on the type of water used.

Keywords: *sodium and potassium ions, milk formulas for children under one year old, potentiometric method.*

Введение. Калий и натрий детям важно получать в полной необходимой и адекватной возрасту норме [1]. Калий совместно с натрием регулирует водный баланс и влияет на нормальную работу детского организма [1]. Молочные смеси, используемые для кормления детей до года, должны быть сбалансированы по минеральному составу [2]. По мнению большинства педиатров и специалистов, правильное искусственное вскармливание должно полностью обеспечивать нужды детского организма в калии и натрии до года [3]. Детская питьевая вода, используемая для питьевых целей и приготовления молочных смесей должна быть физиологически полноценной [4]. При приготовлении молочных смесей для детского питания должен соблюдаться калиево-натриевый баланс, так как избыток или недостаток этих элементов может быть вреден для здоровья ребенка.

Цель работы. Оценить содержание катионов натрия и калия потенциометрическим методом в воде и молочных смесях, приготовленных на различных типах вод.

Материалы и методы исследования. В работе использовали адаптированные молочные смеси (МС) Российского производителя: начальную для питания детей с рождения — МС1 и последующую для питания детей с 6 месяцев — МС2. Для восстановления МС (3 мерные ложки МС в 90 мл воды) использовались горводопроводная кипяченая вода и детская вода двух марок «Архызик» и «ФрутоНяня». Концентрация ионов калия и натрия определена потенциометрическим методом с помощью ионоселективных электродов (иономер «Анион 4100») [5, 6]. Проведена статистическая обработка с использованием пакета прикладных программ EXCEL (версия 2007). Данные представлены в виде средних арифметических величин и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Для установления достоверности различий использовалось t -распределение Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе проведенного исследования было определено содержания ионов калия и натрия в водах, взятых для восстановления МС (табл. 1).

Таблица 1. Данные по определению содержания ионов калия и натрия в питьевых водах

Вода	C_{K^+} (мг/л)	C_{K^+} (мг/л) по данным производителя	C_{Na^+} (мг/л)	C_{Na^+} (мг/л) по данным производителя
Водопроводная кипяченая	$2,1 \pm 0,1$	ГОСТ: 0,8-12,5	$87,4 \pm 0,1$	ГОСТ: 70-150
ФрутоНяня	$11,8 \pm 0,1$	$10,0 \pm 1,2$	$69,7 \pm 0,1$	$52,6 \pm 7,89$
Архызик	$6,7 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,75$	$13,7 \pm 0,1$	$15,0 \pm 2,6$

Найденная концентрация ионов калия и натрия в мг/л соответствует данным производителей и ГОСТ [5, 6] для питьевой воды городского водопровода. Кипяченая водопроводная вода имеет наименьшее содержание ионов калия $2,1 \pm 0,1$ мг/л и наибольшее содержание ионов натрия $87,4 \pm 0,1$ мг/л.

Потенциометрическим методом были определены ЭДС образцов МС, приготовленных на различных типах вод (табл. 2).

Таблица 2. Данные потенциометрического метода по определению содержания калия и натрия в МС, приготовленных на различных типах вод

Образцы	ЭДС, мВ, натрий	ЭДС, мВ, калий
МС1+фругоняня	-92,004	251,293
МС1 +Архыз	-91,254	251,349
МС1+гор.вода	-91,368	251,237
МС2+фругоняня	-91,654	251,405
МС2 +Архыз	-91,762	251,773
МС2+гор.вода	-91,948	251,605

ЭДС данных проб незначительно отличаются друг от друга. Это говорит о том, что содержание ионов калия и натрия в МС, практически не зависит от типа воды, на которой приготовлена МС. По данным наших измерений из исследуемых трех типов воды дополнительно поступит $0,19-1,06$ мг калия и $1,23-7,87$ мг натрия на 100 мл приготовленной МС. Такое изменение в содержании данных ионов при смене типа воды будет лежать в пределах ошибки эксперимента. Рассчитанное среднее значение содержания натрия в порции МС составило $21,8 \pm 0,1$ мг и калия $61,1 \pm 0,1$ мг на 100 мл готового продукта. Эти значения соответствуют данным производителя: МС1 — 17 мг натрия и 65 мг калия; МС2 — 21 мг натрия и 64 мг калия на 100 мл приготовленной МС.

Выводы

1. Потенциометрическим методом измерено содержание ионов калия и натрия в трех типах воды: горводопроводная кипяченая вода и детская вода двух марок «Архызик» и «ФрутоНяня». Содержание данных ионов соответствует концентрации, заявленной производителями и ГОСТ для питьевых вод.

2. Содержание ионов калия и натрия в молочных смесях, приготовленных на данных типах вод, практически не зависит от типа используемой воды и соответствует данным производителя детского питания на 100 мл приготовленного продукта.

Список литературы

1. Тутельян В.А., Конь И.Я. Детское питание: Руководство для врачей. 3-е издание пераб. и допол. М.: Медицинское информационное агентство, 2013. 744 с.

2. Скидан И.Н., Казначеев К.С., Кирилова А.В., Гуляев А.Е. Функциональные пищевые нутриенты в составе детских адаптированных смесей на основе цельного козьего молока // Вопросы практической педиатрии. 2015. № 4. С. 38–48.

3. Каргина О.И., Белоконова Н.А., Тиунова Е.Ю., Астриухина И.И. Буферная емкость молочных смесей, восстановленных различными типами вод // Вопросы питания. 2016. № 3. С. 91–96.

4. Белоконова Н.А., Санникова Н.Е., Бородулина Т.В., Лелекова Р.П., Астриухина И.И. Характеристика состава и свойств смесей для искусственного вскармливания при разведении питьевой водой разного типа // Вопросы детской диетологии. 2015. Т. 13, № 2. С. 17–21.

5. Белоконова Н.А., Ермишина Е.Ю., Наронова Н.А., Бородулина Т.В. Диффузия минерального состава молочных смесей через полупроницаемую мембрану в сравнении с грудным молоком и модельным раствором // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. № 1(24). С. 115–121.

6. Ермишина Е.Ю., Белоконова Н.А., Наронова Н.А., Бородулина Т.В. Определение коэффициентов диффузии и размеров частиц в восстановленных молочных смесях // Успехи современного естествознания. 2018. № 4. С. 23–28.

УДК 637.136.5

Жилинская Н.Т.^{1,2}, Бландов А.Н.², Жарков О.В.¹, Муста оглы Н.М.²

¹ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»,

²ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт»,
Санкт-Петербург, Россия

zhilinskaya_nt@spbstu.ru, blandov.2015@yandex.ru,
zharkov.ov@edu.spbstu.ru, nargul_m@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ СЫЧУЖНОГО ФЕРМЕНТА МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КОЗЬЕМ И КОРОВЬЕМ МОЛОКЕ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЖИРНОСТИ

Сыр занимает одно из первых в ассортименте продуктов питания по пищевой и энергетической ценности. Цель исследования состояла в определении активности сычужного фермента микробного происхождения в молоке козьем и молоке коровьем различной степени жирности. В молоке козьем активность фермента значительно выше. Молоко коровье жирностью 2,5% рекомендовано для ферментации и производства сыра.

Ключевые слова: молоко коровье и козье, сыр, активность микробного сычужного фермента.

Zhilinskaya N.T.^{1,2}, Blandov A.N.², Zharkov O.V.¹, Musta Ogly N.M.²

¹Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,

²Private educational institution of higher education «St. Petersburg
Medical and Social Institute»,
St. Petersburg, Russia

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE MICROBIAL RENNET ENZYME ACTIVITY IN GOAT AND COW MILK OF VARYING FAT CONTENT

Cheese is one of the main food products due to its nutritional and energy value. The experimental aim was to examine the microbial rennet activity in goat and cow milk with different fat contents. Cow milk with 2.5% fat is recommended for the fermentation and the cheese production.

Keywords: cow and goat milk, cheese, microbial rennet, enzyme activity.

Введение. Сыр является важным молочным продуктом и неотъемлемой частью здорового питания благодаря его существенному вкладу в здоровье человека. Среди продуктов питания сыр занимает одно из первых мест по пищевой и энергетической ценности. Сыр является

богатым источником необходимых питательных веществ: белков, биоактивных пептидов, аминокислот, в том числе незаменимых, жиров, жирных кислот, витаминов и минералов [1]. Пищевая ценность сыра определяется высоким содержанием в нем белка, молочного жира, а также минеральных солей и витаминов в хорошо сбалансированных соотношениях и легкопереваримой форме. В 100 г сыра содержится 20–30 г белка, 32–33 г жира, около 1 г кальция, 0,8 г фосфора. Созревший сыр не содержит лактозы и поэтому подходит для питания людей с непереносимостью лактозы. Высокая концентрация незаменимых аминокислот в сыре способствует росту и развитию человеческого организма. Конъюгированная линолевая кислота и сфинголипиды, присутствующие в сыре, могут обладать антиканцерогенными свойствами. Хорошо известно, что высокая концентрация кальция в сыре способствует формированию и поддержанию крепких костей и зубов, а также оказывает положительное влияние на кровяное давление и помогает в похудении в сочетании с низкоэнергетическими диетами.

В основе производства сыра лежит ферментативно-микробиологический процесс, протекание которого зависит от физико-химических свойств молока, состава микроорганизмов закваски, их способности развиваться в молоке, в сгустке и сырной массе и условий технологического процесса. Содержание в мягких сырах белков и других азотистых соединений, представленных в растворимой форме, хорошо усвояемой организмом человека — в 2–3 раза выше, чем в твердых сырах. Мягкие сыры вырабатывают без созревания (1–2 суток), с короткими сроками созревания (5–10 суток) и длительно созревающими (20–45 суток).

В общем виде процесс производства сычужных сыров можно представить следующей схемой:

- 1) подготовка молока к переработке;
- 2) ферментация (свертывание) молока с использованием сычужного фермента;
- 3) обработка сгустка и сырного зерна;
- 4) формование и прессование сыра;
- 5) посолка сыра;
- 6) созревание сыра;
- 7) подготовка сыра к реализации и хранению.

Сычужный фермент — одно из тривиальных названий его активного компонента ренина (химозина), фермента из класса гидролаз, который вырабатывается в желудочных железах некоторых млекопитающих. У жвачных животных вырабатывается железами сычуга (4-го

отдела желудка). Другими животными источниками сычужного фермента являются овцы (самки овец) и козлята.

В настоящее время в производстве сыров телячий сычужный фермент и прочие молокосвертывающие ферментные препараты животного происхождения уступили свое место на рынке микробным ферментам [2]. Для вегетарианского сыра сычужный фермент получают из бактериальных или грибковых источников или генетически модифицированных микроорганизмов [3].

Ферментный препарат микробного происхождения производится посредством ферментации генетически модифицированных грибов *Mucormiehei*, *Cryphonectria (Endothia) parasitica*, *Rhizomucormiehei*. Также его могут получать путем ферментации молочных дрожжей *Kluveromyceslactis* из особых штаммов молочных грибов. Сгусток у этого фермента получается более мягким, рыхлым и не имеет такой плотности как у фермента натурального происхождения. Микробный фермент имеет некоторые преимущества в температурных режимах работы, рекомендованные рабочие температуры у некоторых ферментов 50–60 °С, его используют в сырах с высокими температурами повторного нагревания [4, 5].

Способность молока свертываться под действием сычужного фермента зависит от содержания в молоке растворимых солей кальция, зрелости молока, его кислотности. Под действием внесенного сычужного фермента происходит гидролиз полипептидных цепей к-казеина (казеинаткальцийфосфатного комплекса) между фенилаланином и метионином. В результате молекулы к-казеина распадаются на гидрофобный пара-к-казеин и гидрофильный гликомакропептид.

Цель исследования. Определение активности сычужного фермента микробного происхождения в молоке козьем и молоке коровьем различной жирности для установления возможности применения фермента в сыроделии.

Материалы и методы. Виды исследуемого молока по происхождению:

1. Молоко коровье питьевое пастеризованное с массовой долей жира 1,0% (Россия, Ленинградская область).
2. Молоко коровье питьевое пастеризованное с массовой долей жира 2,5% (Санкт-Петербург, Россия).
3. Молоко коровье питьевое пастеризованное цельное с массовой долей жира 3,4–4,0% (Россия, Волгоградская область).
4. Молоко козье цельное питьевое пастеризованное с массовой долей жира 2,8–4,0% (Россия, г. Великий Новгород).
5. 1% раствор микробного сычужного фермента (Япония).

Активность сычужного фермента определяли физико-химическими методами [6].

Приборы: химический стакан емкостью 100 мл, пипетка градуированная объемом 1 мл, секундомер, водяная баня (температура бани в течение всего опыта должна быть равна +35° С).

Ход определения: в химический стакан наливают 50 мл молока и ставят на водяную баню с температурой +35° С. Через 3–5 мин к молоку прибавляют 0,5 мл 1% раствора сычужного фермента, быстро перемешивают и включают секундомер. Наблюдают за свертыванием молока легким покачиванием стакана или прикосновением к молоку стеклянной палочкой; появление хлопьев и сгустка показывает начало свертывания. По секундомеру отмечают продолжительность свертывания, т.е. время с момента внесения в молоко сычужного фермента до появления хлопьев.

Активность сычужного фермента вычисляли по формуле:

$$A = (a \times 40) / (0,005 \times n), \quad (1)$$

где A — активность сычужного фермента в условных единицах (у.е.); a — количество взятого молока (мл); 40 — стандартное время свертывания молока (минуты); 0,005 — масса сычужного фермента, взятого на анализ; n — продолжительность свертывания молока в эксперименте (минуты).

Математическая обработка результатов исследования включала: нахождение среднего значения, отклонение результата, среднеквадратичного отклонения и нахождение предельной ошибки выборки в заданном доверительном интервале с применением компьютерной программы MS Excel [7].

Результаты и их обсуждение. Проведены исследования показателя рН молока до и после створаживания, результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1. рН молока до и после ферментации

Образец молока	рН молока до ферментации	рН молока после ферментации
Молоко коровье 1% жирности	6,0	6,0
Молоко коровье 2,5% жирности	7,5	6,5
Молоко коровье 3,4–4,0% жирности	7,0	6,5
Козье молоко 2,8–4,0%	6,5	5,5

Данные, представленные в табл. 1, показали, что в процессе ферментации (створаживания) молока значения рН снижались от 7,5 до

5,5 в зависимости от вида молока и его жирности. В молоке коровьем 1% жирности значения pH — без изменений.

В ходе работы проведены исследования времени ферментации (створаживания) молока, результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2. Время ферментации молока

Образец молока	Время ферментации (створаживания), мин
Молоко коровье 1% жирности	–
Молоко коровье 2,5% жирности	0,81±0,59
Молоко коровье 3,4–4,0% жирности	40,13±0,36
Молоко козье 2,8–4,0% жирности	0,94±0,87

Расчет активности сычужного фермента произвели по формуле (1). Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Активность сычужного фермента

Образец молока	Активность сычужного фермента, у.е.
Молоко 1% жирности	–
Молоко 2,5% жирности	42643,92±271,60
Молоко 3,4–4,0% жирности	13386,88±20,96
Козье молоко 2,8–4,0% жирности	60790,27±806,06

На молоко с жирностью 1% сычужный фермент никак не повлиял. Процесс свертывания молока не начался, и время створаживания превышало 3 часа, что превышает норму времени створаживания в 4,5 раза.

В молоке коровьем жирностью 2,5% среднее значение начала процесса створаживания — 8,55 минут, а среднее значение полного створаживания — 9,38 минут. Свертывание молока от начала створаживания до полного загустения произошло за (0,81±0,59) минут.

В молоке коровьем жирностью 3,4–4,0% среднее значение начала процесса свертывания — 29,88 минут, а среднее значение полного створаживания — 70,03 минут. Свертывание молока от начала створаживания до полного загустения произошло за (40,13±0,36) минут.

В козьем молоке среднее значение начала процесса створаживания — 5,73 минут, а среднее значение полного створаживания — 6,58 минут. Свертывание молока от начала створаживания до полного загустения произошло (0,94±0,87) минут.

Заключение. Самая быстрая скорость ферментации (створаживания) была у козьего молока, на втором месте — молоко с жирностью 2,5%, на 3-м месте — молоко 3,4–4,0% жирности. В молоке коровьем с жирностью 1% за время проведения опыта фермент не активировался.

Сычужный фермент микробного происхождения активнее всего «сработал» с молоком козьим — 60790,27±806,06 у.е., с молоком коровьим жирностью 2,5% — 42643,92±271,60 у.е., с молоком коровьим жирностью 3,4–4,0% — 13386,88±20,96 у.е.

Результаты исследования показали, что все три вида молока, кроме молока коровьего 1% жирности, являются сыропригодными и сычужный фермент активно действует на него.

Козье молоко является самым благоприятным для действия сычужного фермента. Створаживание молока происходит наиболее быстро и активность фермента значительно выше. Среди образцов коровьего молока самым благоприятным является молоко 2,5% жирности.

Сычужный фермент микробного происхождения может быть рекомендован для производства мягких сыров. Для более эффективного сыроварения рекомендуется использовать козье молоко цельное питьевое пастеризованное с массовой долей жира 2,8–4,0% или молоко коровье питьевое пастеризованное с массовой долей жира 2,5%.

Список литературы

1. Walther Barbara & Schmid, Alexandra & Sieber, Robert & Wehrmuller, Karin. (2008). Cheese in nutrition and health. Dairy Science and Technology. 88. 10.1051/dst:2008012.
2. Мягконос Д.С. и др. Перспективы использования микробных заменителей химозина в сыроделии // Сыроделие и маслоделие. 2019. № 4. С. 16–19.
3. Zumrut begum Ogel. Microbial Production of Recombinant Rennet: Recent Developments. In book: Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology (pp. 222–233). April 2018.
4. Ларичев О.В. Влияние ферментов на качество сыров // Сыроделие и маслоделие. 2003. № 3. С. 22–23.
5. Репелиус К., Макеев В.Н., Яркина Д.М. Молокосвертывающие ферментные препараты и их роль в сыроделии // Переработка молока. 2004. № 4. С. 22–23.
6. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины: учебное пособие. СПб.: Университет ИТМО, 2015. 106 с.
7. Гребенникова И.В. Методы математической обработки экспериментальных данных: учебно-методическое пособие. Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 2015. 124 с.

УДК 615.31

**Катаева Н.Н., Шукишина А.А., Шукишина Я.А., Чернецова А.Д.,
Панкратова А.Д., Белоконова Н.А.**

*ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский
университет» Минздрава России,
Екатеринбург, Россия
shukshinaanya2003@mail.ru*

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ АНТИБИОТИКА ДИОКСИДИНА

В статье представлены результаты измерений водородного показателя и удельной электропроводности водных растворов антибиотика диоксидина разной концентрации. Изучена способность диоксидина к адсорбции на полярном и неполярном сорбентах.

Ключевые слова: диоксидин, антибиотик, физико-химические свойства.

**Kataeva N.N., Shukshina A.A., Shukshina Y.A.,
Chernetsova A.D., Pankratova A.D.**

*Department of General Chemistry Ural State Medical University
Ekaterinburg, Russia*

INVESTIGATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF AQUEOUS SOLUTIONS OF THE ANTIBIOTIC DIOXIDIN

The article presents the results of measurements of the hydrogen index and the specific electrical conductivity of aqueous solutions of the antibiotic dioxidin of different concentrations. The ability of dioxidin to adsorb on polar and non-polar sorbents has been studied.

Keywords: dioxidin, antibiotic, physicochemical properties.

Введение. Многолетний разноплановый опыт широкого практического использования диоксидина свидетельствует о высокой эффективности этого препарата, как при местном, так и системном применении. Описаны успешные результаты его действия при инфекциях кожи, мягких тканей, тяжелой пневмонии, остеомиелите, в оториноларингологии, у пациентов урологического и абдоминального профиля. В течение многих лет диоксидин применялся для периперационной профилактики. Уникальной особенностью гидроксиметилхиноксалин-диоксида является его повышенная активность в анаэробных условиях [1].

По классификационным признакам препарат является синтетическим по происхождению, по типу действия бактерицидным, то есть вызывает гибель бактерий, по механизму биологического действия — это ингибитор синтеза нуклеиновых кислот. Наши тела состоят из эукариотических клеток. В то время как бактерии — прокариоты, поэтому для лечения бактериальных инфекций необходимо разрабатывать противомикробные препараты, которые нацелены только на прокариотические клетки, оставляя наши клетки максимально невредимыми. Одной из таких мишеней для воздействия препаратов является ДНК бактерий. Поэтому эти антибиотики называются ингибиторами ДНК или ингибиторами нуклеиновых кислот [5].

Механизм бактерицидного действия диоксидина заключается в повреждении биосинтеза ДНК микробной клетки. Действуя на два жизненно важных фермента микробной клетки — ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, диоксидин нарушает синтез ДНК. Молекулы антибиотика связываются непосредственно с однонитевой ДНК, образуемой гиразой, и реагируют с азотистыми основаниями за счет образования водородных связей своих 3-карбокси- и 4-оксогрупп. Диоксидин стабилизирует связывание ДНК и гиразы, обуславливая конформационные изменения комплекса или препятствуя внутренней подвижности субъединиц гиразы. Это происходит перед разрывом ДНК, в результате прекращается не только репликация, но и транскрипция. Таким образом, антибиотик разрушает генетический материал бактерии и препятствует построению ДНК микробов, поэтому микроорганизмы погибают [3].

Антибиотик выпускается в двух лекарственных формах: мазь и раствор. Мазь используется для наружного применения, а раствор в разных концентрациях для наружного применения и внутриполостного введения. Кроме того, в хирургии для наружного применения используется хлоргексидин-диоксидиновая смесь на водной основе [2, 4].

Не только особенности химического строения действующего лекарственного вещества, но и его физико-химические свойства обуславливают механизм действия данного препарата.

Цель исследования — изучить физико-химические свойства водных растворов противобактериального препарата диоксидина разной концентрации.

Задачи исследования: измерить рН, удельную электропроводность водных растворов диоксидина разной концентрации, оценить на каком сорбенте более эффективно происходит адсорбция диоксидина.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования был взят раствор для инфузий и наружного применения, из ко-

того был приготовлен исходный раствор с концентрацией 1000 мг/л. Далее методом разбавления была приготовлена серия растворов в диапазоне концентраций от 50 до 550 мг/л. Для водных растворов диоксида с полученной концентрацией, было произведено измерение показателей удельной электропроводности и водородного показателя. Было проведено исследование зависимости адсорбционной способности водного раствора диоксида от природы сорбента путем смешивания навески сорбента с водным раствором диоксида, выдерживание происходило в течение 10 минут, затем отфильтровывали. Изменение концентрации диоксида в фильтрате после адсорбции определяли оценивали по изменению удельной электропроводности растворов. pH растворов устанавливали с помощью pH-метра со стеклянным электродом «рН-150МИ» (ООО «Измерительная техника», Москва; погрешность измерения $\pm 0,05$). Определение удельной электропроводности производили на кондуктометре «Анион 7020» (ООО НПП «Инфраспек-Аналит», Новосибирск; погрешность измерения $\pm 2\%$). Графики и диаграммы зависимостей «свойство–концентрация» были построены в программе Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты зависимости pH исследуемых водных растворов от концентрации (50–550 мг/л) приведены на рисунке 1. По химическому строению диоксид представляет собой органическую молекулу, содержащую ОН-кислотные центры, которые депротонируются в водной среде, тем самым уменьшая pH раствора. То есть водородный показатель смещаться в кислую область из-за увеличения концентрации свободных ионов в растворе. На графике видно, что уровень pH относится к слабокислой среде в интервале 5,26–6,29.

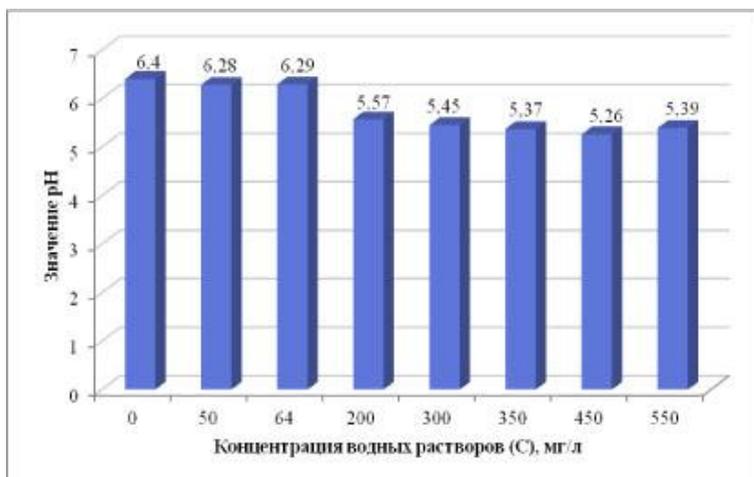


Рис. 1. Диаграмма зависимости водородного показателя от концентрации диосидина

График изменения удельной электропроводности в зависимости от концентрации антибиотика в водном растворе представлен на рисунке 2. При увеличении концентрации диосидина увеличивается степень диссоциации по кислотным центрам, следовательно, возрастает число свободных ионов и снижается электростатическое взаимодействие между ними, соответственно, увеличивается электропроводимость растворов. Диосидин является слабым электролитом. Данный факт подтверждается наличием нелинейной зависимости удельной электропроводности от концентрации антибиотика (рис. 2).



Рис. 2. График зависимости удельной электропроводности от концентрации диоксидина

Для изучения адсорбционной способности диоксидина на сорбентах разной природы были использованы неполярный сорбент (черный уголь) и белый уголь (оксид кремния IV) — полярный сорбент. Для фильтратов растворов антибиотика определяли электропроводность. На рис. 3 приведены результаты измерения электропроводности раствора антибактериального препарата до и после адсорбции.

На диаграмме (рис. 3) видно, что при адсорбции происходит уменьшение электропроводности, что связано с понижением концентрации свободных ионов в растворе. Так как антибиотик способен адсорбироваться как на полярном, так и на неполярном сорбентах, можно сделать вывод, что диоксидин обладает дифильной природой. При этом на полярном сорбенте (белом угле) адсорбция проходит лучше. Это видно по более выраженному снижению электропроводности фильтратов после адсорбции на белом угле. Чем меньше электропроводность, тем меньше свободных ионов в растворе.

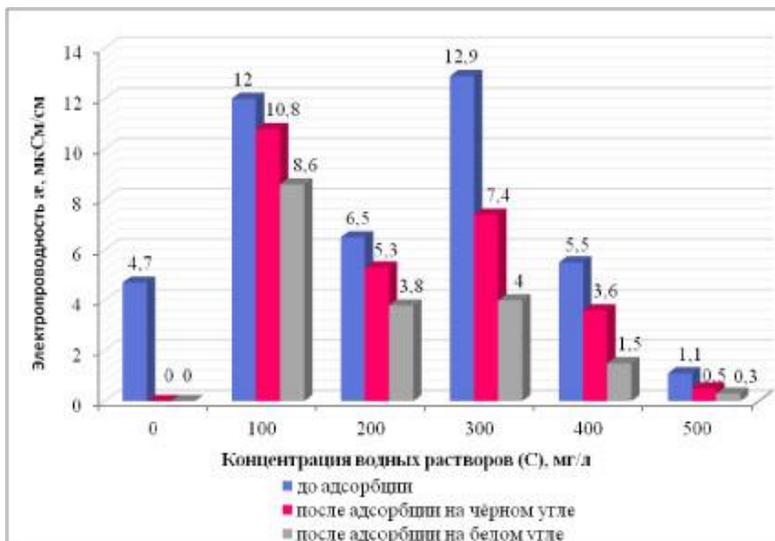


Рис. 3. Электропроводность растворов диоксилина до и после адсорбции

Данный опыт позволяет понять, что при одновременном приеме антибиотиков и энтеросорбентов, диоксилин будет сорбироваться на поверхности сорбента, в результате чего будет снижаться эффективность действия обоих препаратов.

Выводы

1. Водные растворы диоксилина имеют слабокислую среду (рН~5,8).

2. Водные растворы антибиотика обладают электропроводностью. При увеличении концентрации диоксилина нелинейно возрастает удельная электропроводимость растворов, что характерно для поведения слабых электролитов в растворах.

3. Антибиотик адсорбируется как на полярном, так и на неполярном сорбентах, причем адсорбция проходит лучше на полярном сорбенте.

Список литературы

1. Попов Д.А., Анучина Н.М., Терентьев А.А. и др. Диоксидин: антимикробная активность и перспективы клинического применения на современном этапе // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58. № 3–4. С. 37–42. EDN SXWTLV.
2. Катаева Н.Н., Лаптева О.Ю. Оценка взаимосвязи физико-химических свойств хлоргексидин-диоксидиновых смесей с механизмом антисептического действия // Вестник современных исследований. 2018. № 6.3(21). С. 665–668.
3. Желдакова Р.А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов: учебно-методический комплекс для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология». Мн.: БГУ. 2004. 111 с. ISBN 985-485-099-4.
4. Царегородцева А.А., Катаева Н.Н. Оценка эффективности применения антисептика «хлордикс» на основе изучения его физико-химических свойств *in vitro* // Вестник Уральского государственного медицинского университета. 2019. №1. С. 73–75.
5. Диоксидин (Dioxudin) инструкция по применению [Электронный ресурс] // VIDAL. URL: https://www.vidal.ru/drugs/dioxudin__12705 (дата обращения 18.05.22).

УДК 547.1

Ковалев Г.С., Голицына К.О.

*ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Екатеринбург, Россия
kovalev.gregory.26@mail.ru; crianlen@gmail.com*

ИЗУЧЕНИЕ АДсорбЦИИ И ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТВОРОВ АСКОРБАТА И ГЛИЦИНАТА МЕДИ (II)

Исследовали физико-химические свойства растворов аскорбиновой кислоты и глицина, содержащих ионы двухвалентой меди. Определили водородный показатель растворов, осуществили адсорбцию меди из приготовленных растворов. Сравнили влияние состава раствора на скорость подъема пены дрожжей.

Ключевые слова: комплексные соединения, медь, хелаты, аскорбиновая кислота, глицин, адсорбция.

STUDY OF ADSORPTION AND FUNGICIDAL ACTIVITY OF SOLUTIONS OF ASCORBATE AND COPPER (II) GLYCINATE

The physicochemical properties of ascorbic acid and glycine solutions containing divalent copper ions were investigated. Determine the hydrogen index of the solutions, carried out the adsorption of copper from the prepared solutions. The effect of the solution composition on the rate of rise of yeast foam was compared.

Keywords: *complex compounds, copper, chelates, ascorbic acid, glycine, adsorption.*

Актуальность. В последнее время стала активно развиваться медицинская микроэлементология, фармакология комплексных соединений на основе аминокислот, окси-, кетокислот, аскорбиновой кислоты и биогенных металлов. Из всех биометаллов наиболее прочные комплексы с аминокислотами образует медь.

Аскорбиновая кислота является перспективным лигандом. Основным направлением в эволюции фармакологии витамина С считается потенцирование свойств хелатов, их усвоения, снижения риска нежелательных эффектов. Аскорбаты металлов применяют для борьбы с раком как до удаления опухоли, так и после [1].

Аскорбат и глицинат меди (II) — перспективные биологически активные вещества. Имеются данные [2, 3, 4] о способах получения данных соединений с максимальным выходом, но мало изучены процессы адсорбции и механизмы биологической активности этих соединений.

Цель исследования: изучение взаимодействия иона меди с аскорбиновой кислотой и глицином в водном растворе и изучение их адсорбции из растворов, а также их биологической активности.

Материалы и методы. Готовили серию растворов с мольным соотношением иона Cu^{2+} к лиганду 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 с фиксированным содержанием элементной меди и серию растворов, содержащих аналогичные количества вещества лигандов без добавления сульфата меди. В приготовленных растворах измеряли водородный показатель на рН-метре «рН-150 МИ». В приготовленных растворах, содержащих медь и лиганд определяли содержание меди йодметрическим методом и рассчитывали процент меди, вступившей в реакцию относительно холостой пробы, содержащей такое же количество вещества меди в виде сульфата, но не содержащей лиганд. Результаты и наблюдения

представлены в Таблице 1. Наличие меди в растворах подтверждали с помощью качественной реакции с гексацианоферратом калия (II).

Адсорбция меди из приготовленных растворов с соотношением ионов меди к органическому лиганду 1:2 осуществлялась неполярным энтерсорбентом Полифепаном, взятом в количестве, соответствующем разовой дозе (1 столовая ложка). Навеска сорбента добавлялась к 30 мл раствора комплексного соединения. После 10 минут осуществлялась фильтрация через фильтр «Желтая лента». У фильтрата определяли оптическую плотность на фотоколориметре КФК-3.01. По полученному значению оптической плотности по градуировочному графику определялась масса меди, прошедшая через фильтр. Величину адсорбции рассчитывали в мг/г адсорбента. Для того чтобы оценить достоверность спектрофотометрической методики определения адсорбции меди параллельно осуществлялась адсорбция меди из раствора сульфата меди. Содержание меди до и после адсорбции определялось йодметрическим методом. Результаты представлены в табл. 1.

Для сравнения фунгицидной активности полученных водных растворов использовалась методика, описанная в [5]. Использовали растворы, содержащие медь в виде сульфата, глицината и аскорбата. Исходный раствор 0,01 моль по меди разбавляли в 100, 20 и 10 раз и определяли скорость подъема пены через 15 минут после добавления дрожжей. Результаты представлены в табл. 2.

Результаты и их обсуждение. После добавления к раствору сульфата меди органического лиганда и в случае с аскорбиновой кислотой и в случае с глицином наблюдалось снижение величины рН, что говорит о протекании реакции между ионом меди и лигандом.

По данным табл. 1, процент меди, вступившей в реакцию с йодидом калия, для растворов глицината меди во всех случаях выше, чем для аналогичных растворов с аскорбатом. Это говорит о том, что комплексообразующая способность меди по отношению к аскорбиновой кислоте выше, чем по сравнению с глицином. Наличие ионов Cu^{2+} в растворе по окончанию титрования говорит о том, что часть меди оказалась связанной в комплексное соединение и не вступила в реакцию с йодидом калия. Кроме того, в ходе эксперимента мы столкнулись с проблемой: не удалось осуществить йодметрическое определение меди в растворах меди и аскорбиновой кислоты, в которых аскорбиновая кислота была в 2 и 3 кратном избытке. Это связано с тем, что образовавшийся йод взаимодействовал с аскорбиновой кислотой, что объясняется наличием в растворе свободной, не связанной в комплексное соединение аскорбиновой кислотой. В растворах, в которых аскорбиновая кислота была не в

избытке по отношению к ионам меди, такого не наблюдалось, потому что вся аскорбиновая кислота связывалась в комплексное соединение.

Таблица 1. Результаты определения содержания меди в приготовленных растворах

Соотношение Cu^{2+} : аскорбиновая кислота	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3
Количество меди, вступившее в реакцию, %	83,1	49,4	5,2	–	–
Наблюдения	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}
Адсорбция, мг/г	–	–	–	1,68	–
Соотношение Cu^{2+} : аск. к-та	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3
Количество меди, вступившее в реакцию, %	88,5	100	85,3	81,9	79,3
Наблюдения	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}	По окончании титрования в растворе присутствуют ионы Cu^{2+}
Адсорбция, мг/г	–	–	–	1,18	–

Величина адсорбции меди из раствора сульфата меди составила 2,43 мг/г, в то время как для растворов с органическими лигандами эта величина оказалась приблизительно в два раза ниже. Состав раствора оказывает влияние на адсорбцию ионов меди на неполярных адсорбентах.

Сульфат меди взаимодействует с белками, образуя с ними солеобразные альбуминаты. Этим объясняются его вяжущее и прижигающее действие, а также бактерицидные и фунгицидные свойства.

Для доступного и быстрого исследования фунгицидной активности комплексных соединений меди использовались дрожжи (препарат сухих пекарских дрожжей «Саф-Момент», «Саф-Нева»). Данный тест позволяет оценить наличие биологической активности соединений путем анализа скорости подъема пены в исследуемом растворе относительно контрольной пробы. Снижение скорости подъема пены относительно контрольной пробы рассматривали как ингибирующее или фунгицидное влияние, а увеличение — как стимулирующее влияние. В качестве контрольной пробы брали водопроводную воду. Скорость подъема пены в растворе водопроводной воды составила 6 см/мин.

Из табл. 2 видно, что все исследуемые растворы продемонстрировали фунгицидную активность, однако глицинат и аскорбат оказали более сильное воздействие по сравнению с сульфатом. Состав раствора оказывает влияние на биологическую активность меди.

Таблица 2. Фунгицидная активность различных соединений меди

Разбавление	Скорость подъема пены в растворе сульфата меди, см/мин	Скорость подъема пены в растворе глицината меди, см/мин	Скорость подъема пены в растворе аскорбата, см/мин
100	0,44	0,38	0,28
20	0,36	0,29	0,19
10	0,33	0,23	0,15

Выводы:

1. Комплексообразующая способность меди по отношению к аскорбиновой кислоте выше по сравнению с глицином.
2. Наличие ионов меди в растворе после титрования показало, что часть меди связалась в комплекс и не прореагировала с иодидом калия.
3. В растворах, в которых аскорбиновая кислота была в избытке, не получалось определять содержание меди йодометрическим методом.

Такое не наблюдалось в растворах, где кислота была не в избытке по отношению к меди.

4. Наибольшая адсорбция наблюдалась из раствора сульфата меди. Адсорбция меди из глицината, выше, чем из аскорбата, что опять же говорит о большей устойчивости комплексов меди с аскорбиновой кислотой.

5. У аскорбата меди наблюдалась большая фунгицидная активность, по сравнению с другими соединениями.

Список литературы

1. Громова О.В. Витамин С (обзор) // Эстетическая медицина. 2007. Т. 4. № 2. С. 112–116.

2. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Изучение реакции комплексообразования аскорбиновой кислоты с ионами цинка и меди (II) // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2015. С. 118–123.

3. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Синтез медных и цинковых солей метионина и глицина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2013. С. 109–115.

4. Поляков С.В. Исследование комплексообразования ионов меди (II) с глицином // В мире научных открытий. 2016. № 6. С. 160–162.

5. Жданова Г.О. и др. Использование *saccharomyces cerevisiae* для оценки биологической активности лекарственных препаратов // Сибирский медицинский журнал. 2013. № 4. С. 104–106.

УДК 547-31/-39

**Кокорина М.Л., Есаулкова А.Н., Жиялков А.А.,
Катаева Н.Н., Белоконова Н.А.**

*ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский
университет» Минздрава России,*

*Екатеринбург, Россия
rita.kokorina@gmail.com*

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ЦЕФТРИАКСОНА К АДОРБЦИИ И КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЮ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

В статье изучена способность цефтриаксона к адсорбции на полярном и неполярном сорбентах, а также комплексообразующих свойств цефтриаксона по отношению к ионам цинка и магния.

Ключевые слова: *цефтриаксон, антибиотик, адсорбция, комплексообразование.*

**Kokorina M.L., Esaulkova A.N., Zhiljakov A.A.,
Kataeva N.N., Belokonova N.A.**

*Ural State Medical University,
Ekaterinburg, Russia
rita.kokorina@gmail.com*

STUDY OF THE CEFTRIAZONE ABILITY TO ADSORPTION AND COMPLEX FORMATION IN VITRO

The article studied the ability of ceftriaxone to adsorb on polar and non-polar sorbents, and the complexing properties of ceftriaxone with respect to zinc and magnesium ions.

Keywords: *ceftriaxone, antibiotic, adsorption, complex formation.*

Введение. Цефтриаксон (ЦТА), Ceftriaxone, Ceftriaxonum (род. *Ceftriaxoni*) — полусинтетический цефалоспориновый антибиотик III поколения широкого спектра действия [1].

По химическому строению антибиотик (АБ) принадлежит к группе β -лактамных соединений, близких к пенициллинам. Основу молекул цефалоспоринов составляет цефем-группа, состоящая из соединенных циклов — β -лактамного и дигидроимидазинового. Цефем-группа определяет антимикробную активность цефалоспоринов, разрыв циклов приводит к полной потере антимикробных свойств. В отличие от пенициллина, цефалоспорины подавляют развитие не только грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus, pyogenes, pyogenes* и др.), но и грамотрицательных (*Haemophilus parainfluenzae, Neisseria meningitidis, Proteus mirabilis, vulgaris, Treponema pallidum* и др.), также они устойчивы к действию β -лактамаз [2].

Молекула цефтриаксона содержит одну карбоксильную группу, однако при этом цефтриаксон ведет себя как двухосновная кислота, поскольку имеет также гидроксильную группу гидрокситриазинового цикла боковой цепи молекулы (рис. 1). При этом аминотиазольная группа другой боковой цепи проявляет слабые основные свойства и способна к протонированию в кислой среде [2].

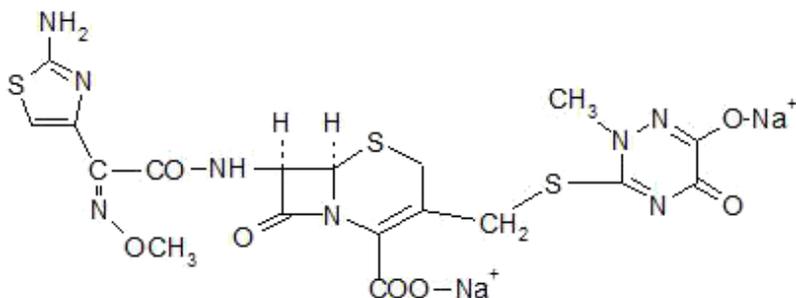


Рис. 1. Структурна формула цефтриаксона в форме натриевой соли

Цефтриаксон образует натриевую соль $\text{Na}_2\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$. Именно в такой форме он используется в медицине [2]. Бактерицидная активность цефтриаксона обусловлена подавлением синтеза клеточных мембран [1]. Учитывая фармакокинетические способности цефтриаксона, а именно хорошее проникновение в цереброспинальную жидкость и создание достаточно высоких бактерицидных концентраций в ликворе, некоторыми зарубежными исследователями рассматривалась возможность применения данного препарата в лечении больных с сифилитическим поражением нервной системы, в том числе инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) [3].

Исследования на адсорбционную способность β -лактамов также проводилось. Иммунизация антибиотиков и их полимерных комплексов на активированных углях приводит к изменению распределения по размерам частиц угольных суспензий в воде. К увеличению содержания в суспензии более мелких частиц приводит адсорбция и полимера, и его комплексов с антибиотиком, причем в последнем случае достигается наибольшее содержание частиц субмикронного размера. В то же время практически аналогичный эффект оказывают и индивидуальные антибиотики, адсорбция которых на поверхности угольных частиц способствует дезагрегированию последних. При разработке таблетированной лекарственной формы этих антибиотиков данное свойство должно обеспечить хорошую распадаемость таблеток в водной среде и более высокую эффективность их терапевтического действия [4].

Изучение комплексообразования субстратов и ингибиторов β -лактаманной структуры уже проводились. Было доказано, что присутствие ионов биометаллов в комплексе с лекарственным средством может в значительной степени уменьшить токсичность препарата, а также

усилить антимикробный эффект. Объясняется это тем, что экзогенные лиганды, образующие с ионами биометаллов, в том числе и с Zn(II), Mg, Cu(II), координационные соединения, потенциально обладают способностью ингибировать или активировать многие металлоферменты [5].

Однако интерес к поиску новых, более эффективных ингибиторов все еще остается. Одно из исследований основано на подборе соединений, образующих стабильные ковалентные комплексы с ферментом. Результаты данного исследования показали, что мутантные формы β -лактамаз образуют с ингибиторами более стабильные, долгоживущие комплексы [6].

Органические молекулы антибиотиков могут выступать в качестве лигандов по отношению к металлам-макроэлементам организма. В условиях *in vitro* была показана способность противовирусного препарата триазавирина к комплексообразованию с ионами магния [7].

Цель исследования — изучить способность цефтриаксона к адсорбции на сорбентах разной природы; оценить возможность комплексообразования цефтриаксона с катионами магния и цинка.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования данной работы является препарат цефтриаксон в форме лиофилизата для приготовления раствора для инфузий во флаконах с дозировкой 250 мг. Перед проведением экспериментов готовили серию водных растворов антибиотика с концентрациями: 100, 200, 300, 400, 500 мг/л.

Для оценки способности цефтриаксона к адсорбции брали одинаковые навески (1г) сорбентов, таких как активированный уголь и каолин. К раствору антибиотика добавляли сорбент, выдерживали в течение 10 минут и затем отфильтровывали. Далее измеряли электропроводность фильтрата на кондуктометре «Анион 7020» (ООО НПП «Инфраспек-Аналит», Новосибирск; погрешность измерения $\pm 2\%$). Потом проводили сравнение результатов электропроводности раствора цефтриаксона до и после адсорбции.

Для исследования комплексообразования использовали метод титриметрии с целью определения содержания свободных ионов цинка и магния в растворах с антибиотиком.

Результаты и их обсуждение

По табл. 1 видно, что с увеличением концентрации ЦТА в растворе повышается его электропроводность. Это объясняется тем, что ЦТА представлен натриевой солью, которая является сильным электролитом, а значит хорошо проводит электрический ток. Адсорбция проводилась на неполярном сорбенте — угле, и полярном сорбенте — каолине. Чем больше адсорбируются ионы ЦТА на сорбенте, тем меньше

ионов останется в растворе, следовательно, электропроводность будет ниже. Поскольку ЦТА адсорбировался на обоих сорбентах, о чем говорит снижение электропроводности в табл. 1, то он является дифильным, т.е. имеет сродство к полярным и неполярным веществам. При этом электропроводность после адсорбции на каолине ниже, чем на угле. С увеличением концентрации цефтриаксона повышается число свободных ионов в растворе, и, как следствие, электропроводность возрастает.

Таблица 1. Оценка электропроводности раствора ЦТА до и после адсорбции на сорбентах различной полярности ($p \leq 0,05$)

Показатель	Концентрация цефтриаксона, мг/л				
	100	200	300	400	500
Удельная электропроводность до адсорбции, мкСм/см	176	339	478	772	917
Удельная электропроводность после адсорбции на черном угле, мкСм/см	144	290	389	671	852
Удельная электропроводность после адсорбции на каолине, мкСм/см	140	333	402	735	881

По данным табл. 2 видно, что с увеличением концентрации антибиотика в растворах концентрация магния (II) практически не меняется, а концентрация свободных ионов цинка — уменьшается по сравнению с холостой пробой.

Таблица 2. Результаты трилометрического определения концентрации ионов магния и цинка в растворах с цефтриаксоном ($p \leq 0,05$)

Показатель	Холостая проба	Концентрация цефтриаксона, мг/л				
		100	200	300	400	500
Содержание магния — $S(Mg^{2+})$, мг/л	103,6	100,8	102	103,8	106,8	109,2
Содержание цинка — $S(Zn^{2+})$, моль·экв/л	0,0018	0,0019	0,00185	0,0017	0,00155	0,00145

В водном растворе цефтриаксона в присутствии индикатора хромогена черного часть ионов цинка связывается в комплекс с антибиотиком, часть — с хромогеном черным. При титровании трилоном Б в точке эквивалентности наблюдается полный переход ионов металлов из слабого комплекса с индикатором в более прочный комплекс с трилоном Б. При этом с увеличением концентрации цефтриаксона, содержание цинка, связанного с трилоном Б, понижается, поскольку цинк (II) частично связывается в комплексное соединение с антибиотиком. Из этого следует вывод, что комплекс цинка с цефтриаксоном прочнее, чем комплекс с трилоном Б.

При аналогичном титровании трилоном Б раствора антибиотика с ионами магния происходит полный переход магния в комплекс с трилоном Б. Возможно, что комплекс цефтриаксона с ионами магния не образуется, или является неустойчивым в присутствии трилона Б.

Образование комплексного соединения цефтриаксона с цинком (II) наиболее вероятно, чем с магнием (II) потому, что у цинка больше радиус атома, больше комплексообразующее число, следовательно, возникает более сильный хелатный эффект.

Выводы. Изучение способности антибиотика к адсорбции показало, что цефтриаксон хорошо адсорбируется как на полярных, так и неполярных сорбентах, т.е. обладает дифильной природой. При этом, адсорбция на полярном сорбенте происходит лучше, чем на неполярном. Одновременный прием антибиотика с энтеросорбентами может приводить к понижению его эффективной концентрации.

Изучение способности к комплексообразованию показало, что цефтриаксон с цинком формирует прочный комплекс по сравнению с трилоном Б. С магнием устойчивого комплексного соединения в присутствии трилона Б не образуется.

Список литературы

1. Справочник лекарственных средств VIDAL. Цефтриаксон: [Электронный ресурс]. URL: https://www.vidal.ru/drugs/ceftriaxone__14795#interaction (дата обращения: 19.09.22).
2. Кряжева И.Ю. Импринтинг цефтриаксона в присутствии ионов меди как способ повышения качества его молекулярных отпечатков. Москва, 2013. С. 31.
3. Катунин Г.Л. и др. Цефтриаксон в лечении больных сифилисом // Вестник дерматологии и венерологии. 2021. Т. 97. № 2. С. 23–31.
4. Савицкая Т.А. и др. Растворимые полимерные комплексы цефтриаксона и цефотаксима с солевыми формами сульфата ацетата целлюлозы

и их адсорбция на угольных сорбентах // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2019. Т. 61. № 3. С. 209–221.

5. Логинова Н.В. и др. Биоактивные металлокомплексы производных пространственно экранированных дифенолов и аминифенолов – новое направление для создания антимикробных и противовирусных средств. 2006.

6. Упоров И.В. и др. Изучение комплексообразования бета-лактамаз TEM-типа с субстратами и ингибиторами методом молекулярной динамики // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2018. Т. 59. № 2. С. 101–110.

7. Kataeva N. Belokonova K. Savateev E. Ulomskij V. Rusinov A. Petrov Study of the complex-forming properties of derivatives of 6-nitroazolo[5,1-c][1,2,4]triazines and 6-nitroazolo[1,5-a][1,2,4]pyrimidines towards magnesium compounds // AIP Conference Proceedings 2280, 050024 (2020).

УДК 615.31

Корнишева А.В., Катаева Н.Н., Белоконова Н.А.
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Екатеринбург, Россия
theradicalmidge@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ЦИКЛОФЕРОНА

В данной статье приведены результаты исследования комплексообразующих свойств противовирусного препарата циклоферона с ионами магния и цинка. Обоснована возможность комплексообразования с точки зрения химического строения циклоферона. В ходе эксперимента продемонстрирована способность циклоферона связывать ионы магния в прочные комплексные соединения в присутствии трилона Б.

Ключевые слова: циклоферон, комплексообразование, химическое строение, комплексные соединения, магний, цинк.

Kornisheva A.V., Kataeva N.N., Belokonova N.A.
Ural State Medical University,
Ekaterinburg, Russia

STUDY OF COMPLEX-FORMING PROPERTIES OF CYCLOFERON

In this article, results of the study regarding complexing properties of anti-viral medicine «Cycloferon» with magnesium and zinc ions are listed. The possibility of complex-forming is substantiated from the standpoint of the chemical structure of «Cycloferon». The ability of

«Cycloferon» to bind magnesium ions into strong complex compounds at the presence of Trilon B is shown experimentally.

Keywords: Cycloferon, complex-forming, chemical structure, complex compounds, magnesium, zinc.

Введение. Одной из главных задач современной фармакологии является создание и разработка эффективных антибактериальных и антивирусных препаратов. Циклоферон (меглюмина акридонацетат) — N-глюкаминная соль акридонуксусной кислоты (10-карбоксиметил-9-акридон) обладает противовирусным, иммуномодулирующим, противоопухолевым и противовоспалительным действием. Данный препарат включен в российский список жизненно важных и необходимых лекарственных средств.

Существует несколько возможных механизмов действия циклоферона. Так, считается, что одним из механизмов действия препарата может быть его прямое связывание с ДНК и/или взаимодействие с ядерными белками, участвующими в регуляции транскрипции различных генов. По другой версии, фармакологическое действие сопряжено с подавлением процессов клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования: присоединяясь к мембране митохондрии, циклоферон ингибирует связывание АТФ с митохондриальной АДФ/АТФ-транслоказой, что ведет не только к уменьшению продукции АТФ, но также к окислительному повреждению мембран и ДНК митохондрий, нарушению их целостности и синтезу активных форм кислорода. Появление в цитоплазме клетки митохондриальной ДНК ведет к ее связыванию с сенсорным рецептором STING, активация которого приводит к запуску сигнального каскада и продукции интерферонов (ИФН) типа I. Таким образом, предполагается, что циклоферон-опосредованная индукция синтеза ИФН идет по сенсорному пути cGAS-STING, являющемуся фактором врожденной защиты клетки от вирусных инфекций [1–3].

С появлением большого количества новых антибактериальных и противовирусных препаратов все более актуальной становится проблема дисбаланса микроэлементов, наблюдающегося при антибиотикотерапии, что, в свою очередь, чревато негативными последствиями со стороны иммунной, сердечно-сосудистой, опорно-двигательной, нервной и многих других систем организма; в частности, например, широко известно о явлении ятрогенного дефицита магния (гипомагниемия), возникающего на фоне длительного приема антибиотиков (прежде всего фторхинолонов и аминогликозидов), что, к сожалению, редко учитывается как серьезный побочный эффект, ассоциированный с применением антибиотиков. Так, цинк и магний являются природными иммуномодуляторами, и их недостаток может приводить к нарушению регуляции процессов воспаления, апоптоза, изменения числа и функций популяций иммунных клеток [4].

Одной из ведущих причин быстрой потери организмом магния и прочих нутриентов при антибиотикотерапии, наряду с нарушением почечного гомеостаза, является образование антибиотиками комплексов, в результате чего концентрация свободных ионов в плазме крови может существенно снижаться [4, 5]. Это подтверждается рядом исследований; в частности, в условиях *in vitro* была показана способность противовирусного препарата триазавирина к комплексообразованию с ионами магния [6]. В связи с этим исследование комплексообразующих свойств циклоферона как широко распространенного и повсеместно применяющегося противовирусного препарата имеет большой практический интерес.

Цель исследования: изучить способность противовирусного препарата циклоферона к образованию комплексных соединений с ионами цинка и магния, а также, основываясь на полученных результатах, сделать соответствующие выводы о необходимости восполнения баланса данных микроэлементов при терапии исследуемым препаратом.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования был взят водный 12,5% раствор циклоферона в ампулах для инъекций объемом 2 мл, из которого был приготовлен исходный раствор с концентрацией 0,25% (2500 мг/л). Далее из исходного раствора методом разбавления была приготовлена серия из пяти растворов в диапазоне концентраций от 200 до 1250 мг/л. При этом к растворам антибиотика добавляли растворы солей магния и цинка, чтобы концентрация каждого катиона металла в приготовленном растворе составляла 1000 мг/л. Определение концентрации свободных ионов цинка и магния, не связавшихся в комплекс с препаратом, производилось методом трилометрии: к приготовленным растворам добавлялось по

5 мл аммиачного буфера и индикатор хромоген черный до появления вишнево-красной окраски, после чего с помощью бюретки производилось их последовательное титрование 0,01 н раствором трилона Б до перехода в синюю окраску; также отдельно было произведено титрование «холостых проб» без добавления циклоферона. По среднему объему трилона Б, пошедшего на титрование, было рассчитано количество ионов Zn^{2+} и Mg^{2+} в исследуемых растворах.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1 ($p \leq 0,05$).

Таблица 1. Результаты определения содержания ионов цинка и магния в растворах методом трилонометрии

Показатель	Холостая проба	Концентрация циклоферона, мг/л				
		200	450	625	1000	1250
Содержание магния — $C(Mg^{2+})$, мг/л	980	930	890	870	830	760
Содержание цинка — $C(Zn^{2+})$, мг/л	990	989	990	987	988	990

По данным таблицы видно, что с ростом концентрации циклоферона содержание свободного магния в растворе по сравнению с холостой пробой постепенно снижается, что свидетельствует об образовании стабильного комплексного соединения.

Для исследования комплексообразующих свойств циклоферона использовался раствор сульфата магния, который в водной среде подвергается диссоциации с образованием большого количества свободных ионов Mg^{2+} . В комплексных соединениях катион магния способен образовывать четыре связи с органическими лигандами — две ковалентные и две связи, формирующиеся по донорно-акцепторному механизму. Анион акридоната, входящий в состав циклоферона, имеет карбоксиметильную группу, которая участвует в образовании ковалентных связей. Гетероатом азота в цикле способен быть донором неподеленной электронной пары, необходимой для формирования донорно-акцепторной связи. В связи с этим на рис. 2 представлена гипотетическая формула комплексного соединения нейтрального типа магния с циклофероном.

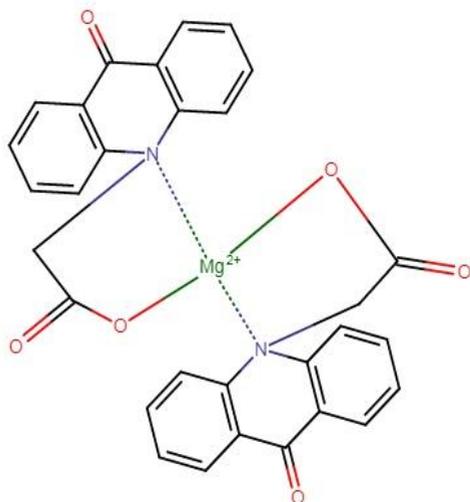


Рис. 2. Гипотетическая структурная формула комплексного соединения магния с акридонацетат-анионом

Несмотря на то, что комплексообразующие свойства циклоферона не настолько выражены, как таковые у антибиотиков (фторхинолонов и аминогликозидов), тем не менее, длительный прием данного препарата может стать причиной гипомагниемии и нарушения баланса микроэлементов в плазме крови. Следовательно, на фоне терапии циклофероном для коррекции возникшего дефицита магния может потребоваться дополнительный прием препаратов Mg^{2+} (например, оротат магния). С осторожностью стоит применять терапию циклофероном для лечения пациентов, чувствительных к гипомагниемии — беременных, а также лиц, страдающих сахарным диабетом, хроническим аутоиммунным тиреоидитом, заболеваниями почек и т.д.

Аналогичным методом трилонометрии было проведено и исследование комплексообразующей способности циклоферона с ионами цинка. Согласно данным таблицы 1, с увеличением концентрации циклоферона концентрация свободного цинка в растворе практически не изменяется по сравнению с холостой пробой, либо меняется незначительно. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что комплексообразования в данном случае либо не происходит, либо образующийся комплекс циклоферона с цинком не устойчив в

присутствии трилона Б, который в ходе титрования полностью связывает цинк в более прочные комплексы.

Выводы

1. Химическое строение циклоферона обуславливает его способность к комплексообразованию с ионами магния и цинка.

2. Циклоферон образует более прочные комплексы с магнием (II) и неустойчивые комплексные соединения с ионами цинка в присутствии трилона Б.

3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в период приема циклоферона следует восполнять баланс магния в организме.

Список литературы

1. Романцов М.Г. Механизмы действия и особенности фармакокинетики циклоферона // Поликлиника. М. 2015. № 2-2. С. 14–15.

2. Бажанова Е.Д. Циклоферон: механизм действия, функции и применение в клинике // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012. Т. 75. № 7. С. 40–44.

3. Ершов Ф.И., Коваленко А.Л., Романцов М.Г., Голубев С.Ю. Циклоферон. Клиническая фармакология и терапия: руководство для врачей. СПб. 1998. 109 с. ISBN 5-88874-040-3.

4. Громова О.А., Торшин И.Ю., Лиманова О.А. и др. Антибиотикотерапия провоцирует дефицит магния. Что делать? // Фарматека. 2016. № 14(327). С. 6–13.

5. Громова О.А., Торшин И.Ю., Моисеев В.С., Сорокина М.А. О фармакологических взаимодействиях магния с антибиотиками и дефиците магния, возникающем в результате антибиотикотерапии // Терапия. 2017. № 1(11). С. 135–143.

6. Kataeva N., Belokonova N., Savateev K., Ulomskij E., Rusinov V., Petrov A. Study of the complex-forming properties of derivatives of 6-nitroazolo [5,1-c][1,2,4] triazines and 6-nitroazolo [1,5-a][1,2,4] pyrimidines towards magnesium compounds // AIP Conference Proceedings 2280, 050024 (2020).

**ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO* ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ
ПРОТИВОАНГИОГЕНЕЗНОЙ АКТИВНОСТИ
ФУНКЦИОНИЗИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ПИОГЛИТАЗОНА**

В работе предложены новые структуры функционализированных производных пиоглитазона. Изучена зависимость структура-биологическая активность in silico с рецептором VEGF. Показано, что активность проанализированных производных пиоглитазона по отношению к фактору роста эндотелия кровеносных сосудов VEGF зависит от природы и взаимного расположения функциональных групп.

Ключевые слова: пиоглитазон, рецептор VEGF, in silico, молекулярный докинг.

**IN SILICO INVESTIGATION OF THE POTENTIAL
ANTIANGIOGENIC ACTIVITY OF FUNCTIONALIZED
PIOGLITAZONE DERIVATIVES**

The paper proposes new structures of functionalized derivatives of pioglitazone. The dependence of the structure-biological activity in silico upon their interaction with the VEGF receptor has been studied. It is shown that the activity of the analyzed pioglitazone derivatives in relation to the endothelial growth factor of blood vessels VEGF depends on the nature and mutual arrangement of functional groups.

Keywords: pioglitazone, VEGF receptor, in silico, molecular docking.

Пиоглитазон является лекарственным средством класса тиазолидинионов, которое используется в качестве гипогликемического средства при диабете второго типа. Само действие данного средства проявляется в его способности к уменьшению инсулинорезистентности. В последнее время в литературе появляется все больше информации о новых функционализированных производных пиоглитазона,

проявляющих широкий спектр противоопухолевой активности с различными молекулярными механизмами действия [4]. Также известно, что быстрорастущие опухолевые клетки вырабатывают белковые молекулы — факторы активации ангиогенеза. Такие молекулы называются факторами роста. Основной из них является фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), более известная под английским названием «vascular endothelial growth factor» (VEGF). Синтез *in vitro* большого числа новых функционализированных производных с последующим исследованием их биологической активности на живых клетках является сложным, долгим и дорогостоящим процессом. Моделирование с помощью компьютерных программ, в частности молекулярного докинга [2], существенно сужает число претендентов для синтеза *in vitro* и изучения биологической активности *in vivo*. Это повышает эффективность исследований по поиску новых лекарственных средств (помогает ограничить количество структур для дальнейших доклинических и клинических испытаний, а также экономит материальные и временные ресурсы).

Цель исследования: провести дизайн структуры функционализированных производных пиоглитазона и изучить их противоангиогенезную активность через изучение зависимости структура-биологическая активность *in silico* на рецептор VEGF.

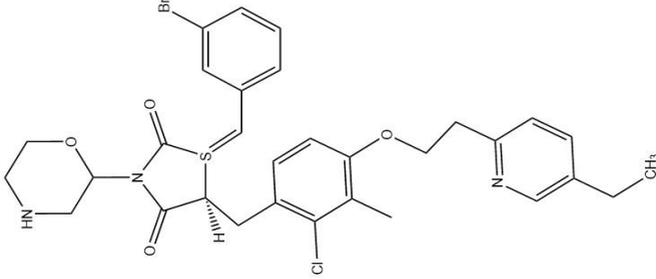
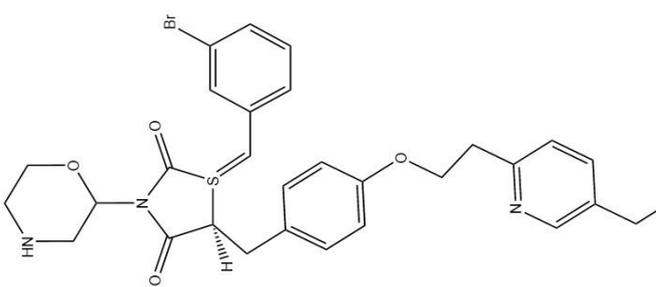
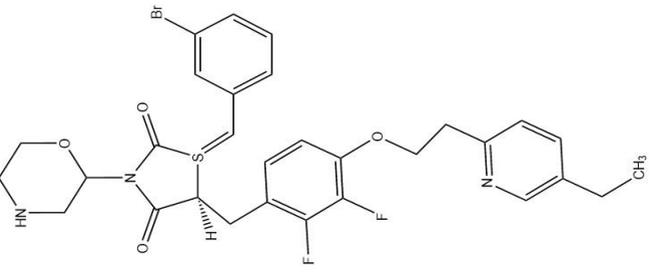
Задачи исследования:

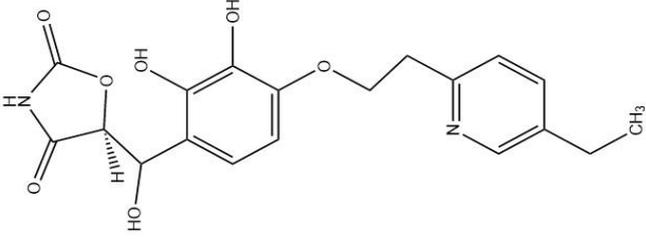
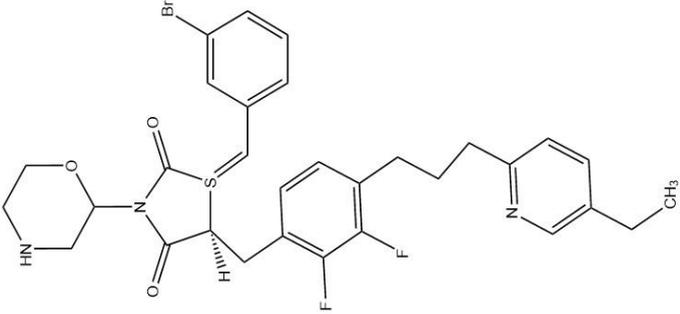
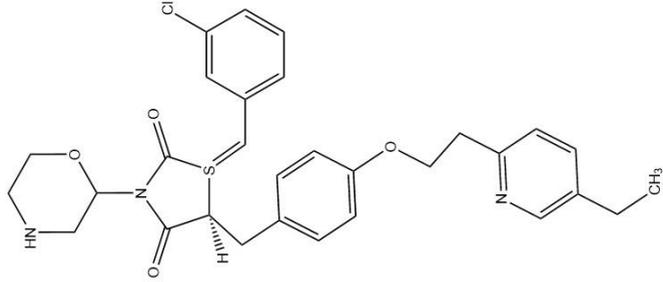
1. Предложить структуры новых функционализированных производных пиоглитазона.
2. Изучить зависимость структура-биологическая активность *in silico*.

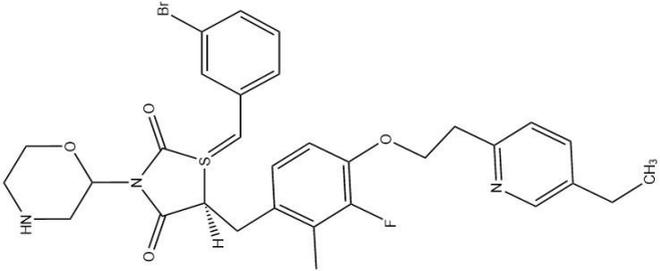
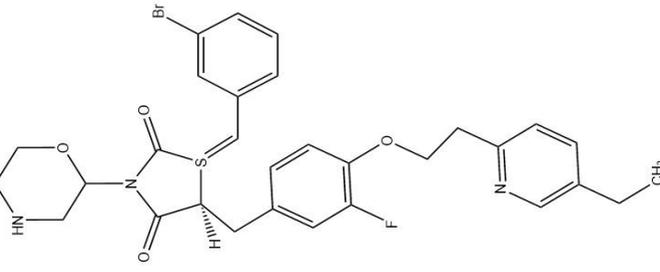
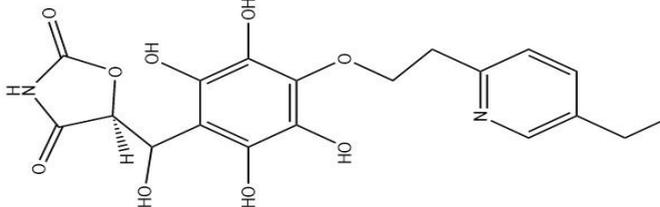
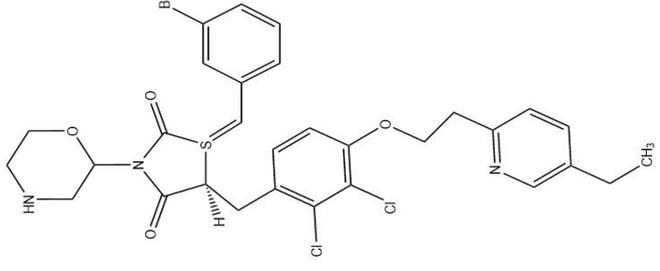
Методы исследования: дизайн структур выполнен с помощью специализированных химических программ ChemOffice. Выбор белков-рецепторов проведен из банка данных 3-D структур белков и нуклеиновых кислот Protein Data Bank (PDB) [3]. Молекулярный докинг *in silico* осуществлен с помощью программы Dockingserver [1].

Результаты исследования. В ходе работы были предложены 13 различных функционализированных структур производных пиоглитазона (табл. 1), а также смоделированы их взаимодействия с рецептором VEGF. Результаты докинг-моделирования представлены в табл. 2.

Таблица 1.

№ структуры	Сtereoхимическая формула
1	
2	
3	

4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	

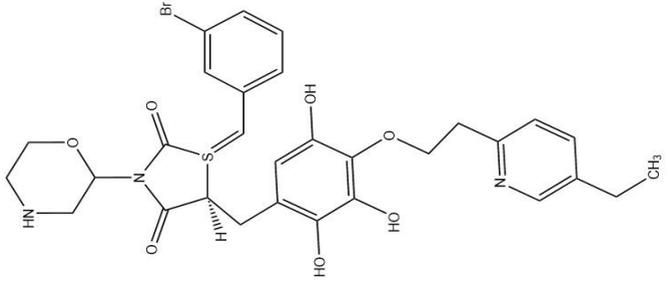
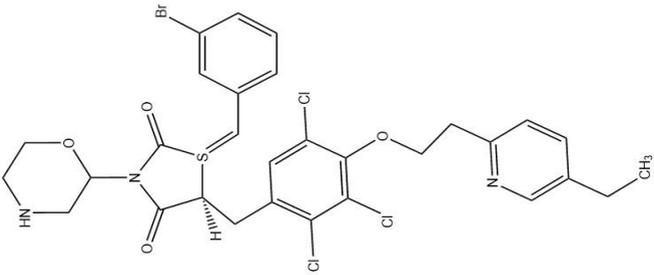
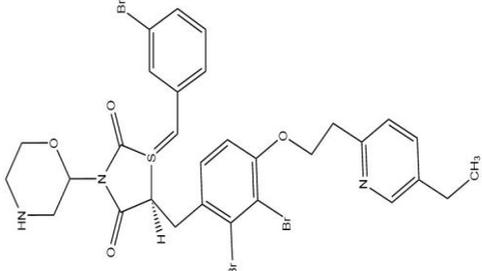
11	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)N=CC=C1C=CC(O)=C(O)C(O)C1=CC=C(C=C1)OCCOCC2=CC=C(C=C2)N=CC=C2C/C=C/C3=CC=C(Br)C=C3S4C(=O)N(C5CCOCC5)C(=O)C4</chem>
12	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)N=CC=C1C=CC(Cl)=C(Cl)C(Cl)C1=CC=C(C=C1)OCCOCC2=CC=C(C=C2)N=CC=C2C/C=C/C3=CC=C(Br)C=C3S4C(=O)N(C5CCOCC5)C(=O)C4</chem>
13	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)N=CC=C1C=CC(Br)=C(Br)C(Br)C1=CC=C(C=C1)OCCOCC2=CC=C(C=C2)N=CC=C2C/C=C/C3=CC=C(Br)C=C3S4C(=O)N(C5CCOCC5)C(=O)C4</chem>

Таблица 2.

Номер структуры производного пиоглиитазона	Энергия связывания, $E_{\text{связ.}}$ (Ккал/моль)	Константа ингибирования, K_i (мкМ)	Поверхность, S (Å) ⁰
1	-5,52	90,27	555,87
2*	-4,86	272,46	603,878
3*	-6,20	28,48	653,402
4	-4,43	567,73	484,054
5*	-5,76	6,36	640,39
6	-4,70	360,53	653,802
7*	-5,38	113,10	702,405
8	-4,97	228,42	543,374
9	-4,37	628,63	497,89
10*	-5,97	41,74	668,257
11	-5,92	45,99	663,829
12*	-5,42	106,49	621,633
13*	-6,42	19,52	655,82

* Отмечены структуры, для которых программа Dockingserver показывала также и места отталкивания с рецептором.



Рис. 1. Корреляция константы ингибирования и энергии связывания функционализированных производных пиоглиитазона при взаимодействии с рецептором VEGF

Из данных табл. 2 видно, что поверхность взаимодействия функционализированных производных пиоглиитазона с рецептором VEGF мало зависит от их структуры и изменяется в пределах 500–700 Å⁰, а вот показатели энергии связывания и константы ингибирования коррелируют между собой и с пространственной структурой соединения. Так, с увеличением энергии связывания, значение константы ингибирования уменьшается (рис. 1).

Соединения, в состав которых входят шестичленные циклы, как правило, имеют большую энергию связывания, а сама энергия связывания зависит от пространственной свободы соединения (табл. 1, 2).

Выводы

1. Активность проанализированных производных пиоглиитазона по отношению к фактору роста эндотелия кровеносных сосудов VEGF зависит от природы и взаимного расположения функциональных групп.

2. Лучшими показателями свободной энергии связывания и константы ингибирования обладает структура под номером 11, содержащая три гидроксильные группы в бензольном цикле, м-бромфенильный радикал, а также морфолин в тиадольном цикле — 5,92 Kcal/mol; K_i=45.99 μM).

3. Результаты исследования можно использовать для синтеза производных пиоглиитазона при изучении их в качестве ингибиторов VEGF в процессе ангиогенеза, вызванного опухолевыми клетками.

Список литературы

1. DockingServer [Электронный ресурс]. Режим доступа к ресурсу: <http://www.dockingserver.244.com/web/>.

2. Kitchen D.B., Furr J.R., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications // Nature Reviews. Drug Discovery. 2004. № 11. P. 935–949.

3. Protein Data Bank [Электронный ресурс]. Режим доступа к ресурсу: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.

4. Rahid M., Shrivastava N., Husain A. Synthesis and sar strategy of thiazolidinedione: a novel approach for cancer treatment // The Journal of the Chilean Chemical Society. 2020. № 2. P. 4819–4832.

УДК 541.49.183:546.562.'723:547.854.5

**Кременевская М.И.¹, Шерстнев В.В.²,
Чухно А.С.³, Романенко М.С.⁴, Тухватуллина Е.Р.⁵,
Рудометова М.О.⁶, Сучкова К.М.⁷**

^{1,2} Университет ИТМО, Институт холода и биотехнологий,

^{3,4} ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,

^{3, 5,6,7} ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-
фармацевтический университет»,
Санкт-Петербург, Россия

²friend-rus77@yandex.ru, ¹mariana_kremenevskaya@mail.ru,

³alex-chuhno@yandex.ru, ⁴marina.romanenko.2001@mail.ru,

⁷s.kseniya2002@yandex.ru, ⁶maria_rudometova@mail.ru,

⁵katheerinee_1@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВО-ПОРИСТЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ НА ОСНОВЕ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА ОСНОВЕ МЕХАНИЗМА ТЕПЛОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

В работе продемонстрирована возможность синтеза белкового пористого материала с помощью тепловой и индуцированной агрегации бычьего сывороточного альбумина. Широкая доступность альбумина делает данный белок удобным объектом для синтеза на его основе бионосителей для различных лекарственных веществ, белков и др., а также его использование в качестве биосорбента.

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

**Kremenevskaya M.I.¹, Sherstnev V.V.², Chukhno A.S.³,
Romanenko M.S.⁴, Tukhvatullina E.R.⁵,
Rudometova M.O.⁶, Suchkova K.M.⁷**

^{1,2}St. Petersburg State University of Information Technologies,
Mechanics and Optics. Institute of Refrigeration and Biotechnology,
^{3,4}North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
^{3,5,6,7}St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
St. Petersburg, Russia

SYNTHESIS OF PROTEIN-POROUS HYDROGELS BASED ON BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) BASED ON THE MECHANISM OF THERMAL AND INDUCED AGGREGATION OF PROTEIN MOLECULES

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

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

Введение. Пористое строение белковых полимеров, а также отсутствие в их составе токсичных веществ, как ранее применявшиеся токсичные альдегиды — открывает возможность их использования в качестве носителя различных биологически активных веществ. Создание таких материалов является актуальной и перспективной задачей на сегодняшний день.

В процессе исследования было сделано предположение, что можно создать нетоксичный белковый полимер, если сначала развернуть все глобулы исходного белка (БСА), используя такие известные, безопасные и доступные вещества, как ацетилцистеин (АЦЦ), раствор этанола и лимонную кислоту. Прогревание полученной реакционной смеси в открытой емкости на электрической плитке, — это еще больше «развернет» глобулы БСА, и сделает реакционную смесь более концентрированной вследствие выпаривания воды, и увеличит вязкость раствора. Под действием температуры в термостате, денатурация БСА вызовет экспонирование слишком большого количества гидрофобных участков белка, а взаимодействия открытых гидрофобных участков, которые нестабильны в водной среде, приведет к агрегации белковых молекул с образованием гидрогеля.

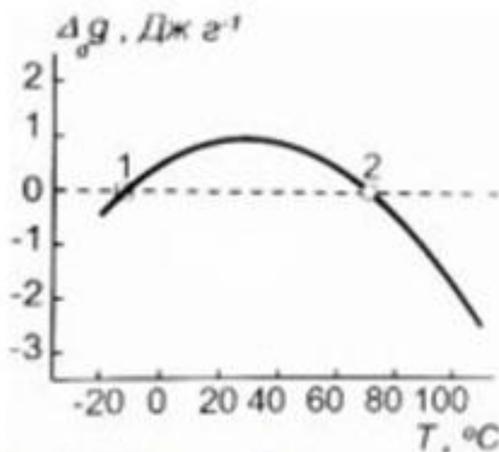


Рис. 1. Температурная зависимость свободной энергии денатурации БСА при рН 7.4 (20 мМ имидазольный буфер, 0,15 М NaCl): точка 1 — точка холодной денатурации ($T_1 = -12^{\circ}\text{C}$); точка 2 — точка тепловой денатурации ($T_2 = 71^{\circ}\text{C}$)

На рис. 1 приводятся термодинамические параметры тепловой денатурации бычьего сывороточного альбумина. Расчеты были выполнены доктором химических наук В.Я. Гринбергом. Они наглядно демонстрируют температурную зависимость свободной энергии денатурации белка в широком интервале температур при рН=7,4. На представленной кривой с пиком в интервале максимальной стабильности альбумина, точка 1 (T_1) — точка холодной денатурации ($T_1 = -12^{\circ}\text{C}$); точка 2 (T_2) — точка тепловой денатурации ($T_2 = 71^{\circ}\text{C}$) [7].

Целью настоящего исследования является изучение специфики механизма образования белково-пористой матрицы, полученной на основе бычьего сывороточного альбумина, а также сам синтез белково-пористой матрицы на основе бычьего сывороточного альбумина, как подтверждение теоретических данных.

Задачами, решаемыми в ходе исследования, являются:

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

- Установить и описать специфику механизма образования белково-пористой матрицы, полученной на основе бычьего сывороточного альбумина, с учетом необходимых условий ее устойчивости во внешней среде (рН среды, температура образования и время выдержки реакционной смеси в термостате).

– Описать строение и свойства новой белково-пористой матрицы — полученного образца геля БСА, полученного с использованием механизма тепловой и индуцированной агрегации белковых молекул.

Экспериментальная часть. Были использованы: бычий сывороточный альбумин (БСА), (BSA — Product number A2153, Fraction V, Sigma — Aldrich Company Ltd, Gillingham, UK). Растворы БСА 10 г/л получали медленным растворением лиофилизированного белка в дистиллированной воде. Раствор этанола (40%), ацетилцистеин ($\geq 99,5\%$), лимонная кислота ($\geq 99,5\%$), дистиллированная вода.

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

Известно, что средняя молярная масса нативного БСА при комнатной температуре составляет $6,6 \times 10^4$ г/моль, гидродинамический диаметр молекулы равен примерно 7 нм [9].

Чтобы рассчитать компоненты реакционной смеси следует исходить из состава молекулы БСА. Молярная концентрация БСА в его растворе с концентрацией 100 мг/мл составляет 1,44 ммоль/л, а общая концентрация остатков цистеина в нем составляет около 50,4 ммоль/л. Таким образом, концентрация SS-связей составляет в нем 25,2 ммоль/л, а количество свободных SH-групп составляет примерно 1.44 ммоль/л, соответственно.

Следовательно, для приготовления исходного раствора для синтеза БСА-криогеля, молярное соотношение свободных SH-групп и растворенного ацетилцистеина должно быть близко к эквимольному, но не более, иначе получится не гель, а более твердая структура криоструктурат.

Ацетилцистеин (*N*-ацетил-*L*-цистеин, NAC) — $C_3H_9NO_3S$, Молярная масса 163,19 г/моль. Для полного насыщения S-S связей свободных SH-групп в водном растворе БСА потребуется не более 1,44 ммоль ацетилцистеина, или $163,19 \times 0,0144 = 2,35$ г. В данном случае, было взято 1,2 г АЦЦ, то есть ацетилцистеин был взят в недостатке (50%). Раствор этанола (40% — 100 мл), необходим в качестве денатурирующего агента. Этанол улетучится в дальнейшем в процессе упаривания реакционной смеси. Кроме того, был использован стабилизирующий агент, — лимонная кислота (1 г), — будет создавать в реакционной смеси среду с рН близкой к изоэлектрической точке БСА (рН=4.7), что будет способствовать устойчивости геля во внешних условиях. Зная эти свойства, была использована именно эта пропорция, найденная опытным путем.

Методика проведения экспериментов. Две навески сухого БСА массой 500 мг растворяли в двух стаканчиках по 50 мл дистиллированной воды в каждом. Затем в каждый стаканчик к полученному раствору, добавляли по 600 мг ацетилцистеина, перемешивали с использованием магнитной мешалки до полного растворения ацетилцистеина. Полученные растворы сливали в одну фарфоровую чашку, прогревали и упаривали на водяной бане на 50% по объему.

К упаренному раствору БСА и АЦЦ добавляли 100 мл водного раствора этанола и перемешивали стеклянной палочкой. Затем повторно упаривали в открытой емкости на электрической плитке до 10 мл. После этого к полученной смеси добавляли 1 грамм лимонной кислоты и перемешивали. Приготовленную таким образом реакцию систему порциями по 5 мл набирали в два 5-миллилитровых пластиковых шприца, которые герметизировали колпачками, а затем помещали в термостат — стеклянный термос, наполненный водой температурой 90 °С, где выдерживали не менее 24 часов. Затем шприцы доставали, охлаждали при комнатной температуре, разбирали, а образец извлекали из шприца. Полученный образец гидрогеля представлял собой вязкопластическую массу, устойчивую во внешних условиях (рис. 2).



Рис. 2. Разбор шприцов с полученным криогелем

Результаты и их обсуждение. Полученный образец гидрогеля БСА устойчив во внешних условиях: сохраняет форму, эластичный и липкий на ощупь (обладает прекрасной адгезией).

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

Аналогичные результаты нами были получены в опытах методом криотропного гелеобразования, в которых шприцы с прогретой реакционной смесью помещали не в термостат с горячей водой (80–90 °С), а в хладагент камеры жидкостного криостата (96% спирт), с температурой (от –20 до –25 °С), где выдерживали в течение 20–24 часов [10]. Результаты данных опытов не противоречат друг другу, а полностью укладываются в термодинамические параметры тепловой денатурации бычьего сывороточного альбумина, представленные ранее на рис. 1.

Выводы

1. Разработана технология получения нового гидрогеля на основе бычьего сывороточного альбумина.

2. Определено, что для синтеза белково-пористого геля необходимо, оптимальное соотношение реагентов: количество молей ацетилцистеина не должно превышать количество молей бычьего сывороточного альбумина.

3. Установлено, что, только используя специфичный метод (метод теплового и индуцированного гелеобразования) — зная состав, строение и свойства исходного белка (бычьего сывороточного альбумина — БСА) — можно получить гидрогель на основе БСА, в термостате при температуре 80–90 °С, в течение 24 часов. Установлено, что полученный образец гидрогеля состоит из массы мелких шариков-глобул, связанных между собой, между которыми есть свободное пространство, — имеет глобулярную широкопористую структуру (диаметр макропор от 50 до 200 мкм). Прогревание реакционной смеси в открытой емкости на электрической плитке с упариванием раствора способствует не только его концентрированию, но и дает начало процессу агрегации молекул белка [10].

1. Выявлено, что устойчивость белково-пористой матрицы на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА) достигается при pH — слабокислом значении, близком к показателю изоэлектрической точки БСА, которое, в свою очередь, достигается в результате действия лимонной кислоты, входящей в состав реакционной смеси.

2. Для формирования устойчивого геля бычьего сывороточного альбумина необходимо совместное действие денатурирующего агента (этанола), восстановителя (ацетилцистеина), концентрирование раствора во время прогрева, и, сам прогрев реакционной смеси в открытой емкости на электрической плитке, а также последующая экспозиция полученной смеси в условиях термостата.

3. Пористое строение полимерных гелей бычьего сывороточного альбумина, полученных с использованием метода теплового и индуцированного гелеобразования, а также отсутствие в их составе токсич-

ных веществ (ранее применялись токсичные альдегиды) открывают возможность их использования в качестве носителя различных биологически активных веществ. Создание таких материалов является актуальной и перспективной задачей на сегодняшний день.

Список литературы

1. Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Мартынов Д.В. Изоэлектрическая точка белков в водных растворах азолов // Вестник Санкт-Петербургского университета. Физика и химия. 2011. № 2. С. 124–133.
2. Курганов Б.И. Кинетика тепловой агрегации белков. Биохимия. 1998. 432 с.
3. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. Успехи химии. 2002. Т. 71. № 6. С. 559–585. doi.org/10.1070/RC2002v071n06ABEN000720.
4. Лозинский В.И. Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения — полимерные криогели // Известия Академии наук. Серия химическая. 2008. Т. 5. С. 996–1014.
5. Лозинский В.И., Кулакова В.К., Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Ершов А.Г., Суханов Ю.В. Композиция для формирования макропористого носителя, используемого при трехмерном культивировании клеток животных или человека, и способ получения указанного носителя. Пат. РФ № 2594427 С1, 2015. 28 с. Бюл. № 23 от 20.08.2016 г.
6. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Изучение необратимой тепловой денатурации белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Успехи биологической химии. 2000. Т. 40. С. 43–84.
7. Родионов И.А. Криогели на основе сывороточного альбумина: синтез, свойства, структура и возможности биомедицинского применения: дис. ... канд. хим. наук. М., 2017. 156 с.
8. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. М.: КДУ, 2012. 456 с.
9. Смирнова Н.Н., Смирнов К.В. Особенности термоагрегации бычьего сывороточного альбумина в присутствии сильных полиэлектролитов. Бултеровские сообщения. 2020. Т. 63. № 9. С. 35–42. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/20-63-9-35.
10. Чухно А.С., Кременевская М.И., Шерстнев В.В., Дмитриева И.Б., Иванова И.С., Попов А.С., Романенко М.С., Жалко М.Е. Исследование специфики механизма образования белково-пористой матрицы на основе бычьего сывороточного альбумина. Бултеровские сообщения. 2022. Т. 69. № 2. С. 127–136. DOI: 10.37952/ROI-jbc-C/22-3-1-4.

УДК 547.772.1 + 547.773 + 547.779.1

Курскова А.О., Кривоколыско С.Г.

ГОУ ВО ЛНР «Луганский государственный университет
имени Владимира Даля»,

Луганск

kursanna120293@gmail.com,

ksg-group-lugansk@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ АМИНОМЕТИЛИРОВАНИЯ 5-АМИНО-3-(ЦИАНОМЕТИЛ)-1Н-ПИРАЗОЛ-4-КАРБОНИТРИЛА

*В условиях реакции Манниха взаимодействие *p*-толуидина, формальдегида и 5-амино-3-(цианометил)-1Н-пиразол-4-карбонитрила приводит к образованию 3-(4-метилфенил)-7-(цианометил)-1,2,3,4-тетрагидропиразоло[1,5-а][1,3,5]триазин-8-карбонитрила. Его строение доказано с применением ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопии, ИК-спектрофотометрии, а также элементного анализа.*

Ключевые слова: *димер малонитрила, гидразингидрат, 5-амино-3-(цианометил)-1Н-пиразол-4-карбонитрил, *p*-толуидин, 3-(4-метилфенил)-7-(цианометил)-1,2,3,4-тетрагидропиразоло[1,5-а][1,3,5]триазин-8-карбонитрил.*

Kurskova A.O., Krivokolysko S.G.

*Volodymyr Dahl Lugansk State University,
Lugansk*

STUDY OF AMINOMETHYLATION OF 5-AMINO-3-(CYANOMETHYL)-1H-PYRAZOLE-4-CARBONITRILE

*Under the Mannich reaction conditions, the interaction of a *p*-toluidine, formaldehyde, and 5-amino-3-(cyanomethyl)-1H-pyrazole-4-carbonitrile leads to the formation of 7-(cyanomethyl)-3-(4-methylphenyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine-8-carbonitrile. The structure of the obtained product was proved using ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, IR spectrophotometry and elemental analysis.*

Keywords: *malononitrile dimer, hydrazine, 5-amino-3-(cyanomethyl)-1H-pyrazole-4-carbonitrile, *p*-toluidine, 7-(cyanomethyl)-3-(4-methylphenyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine-8-carbonitrile.*

В настоящее время высока потребность фармацевтической и ветеринарной отраслей в новых лекарственных препаратах, инсектицидах

и фунгицидах. Это ориентирует и определяет цели органического синтеза, который предполагает разработку совершенно новых, экономически и технологически выгодных, более безопасных методов синтеза, в получении ранее неизвестных биологически активных соединений.

Димер малонитрила (2-аминопропен-1,1,3-трикарбонитрил) **1**, благодаря наличию трех цианогрупп в качестве мощных акцепторов электронов и наличию аминогруппы, является важнейшим исходным реагентом в построении различных гетероциклических соединений. Интерес к димеру малонитрила значительно возрос за последние годы, что свидетельствует о его значимости и перспективности [1].

В продолжение наших научных исследований в области получения производных димера малонитрила [2] нами изучена реакция 5-амино-3-(цианометил)-1*H*-пиразол-4-карбонитрила **2** с *p*-толуидином **3**. Так, аминопиразол **2** был легко получен по известной методике [3] при взаимодействии соединения **1** с гидразингидратом в этаноле в качестве растворителя (рис. 1).

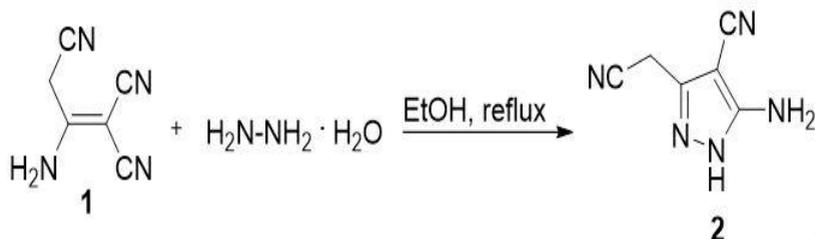


Рис. 1

Необходимо отметить, что за свою более чем столетнюю историю реакция Манниха продемонстрировала себя как эффективный и широко применимый во многих известных синтезах лекарственных препаратов инструмент в арсенале химика-синтетика [4].

Реакция аминотетилирования является весьма распространенным подходом к получению различных гетероциклических соединений. Наличие в структуре аминопиразола **2** нескольких активных реакционных центров делает эту молекулу перспективным объектом для наших исследований [5].

Так, в ходе взаимодействия аминопиразола **2** с избытком 37%-го водного формальдегида и двукратным количеством первичного амина

(*p*-толуидина) в этаноле при кратковременном кипячении (1–2 мин) нами было получено ранее неизвестное соединение **4** (рис. 2). Полученный продукт коричневого цвета имеет мелкокристаллическую структуру, а его выход составляет 24%. В настоящее время нами проводятся дальнейшие исследования по подбору оптимальных условий проведения этой реакции с достижением более высоких выходов целевого продукта, изучению его химических и биологических свойств.

Строение соединения **4** было изучено с использованием методов ЯМР спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C (DEPTQ), а также ИК-спектрофотометрии и элементного анализа.

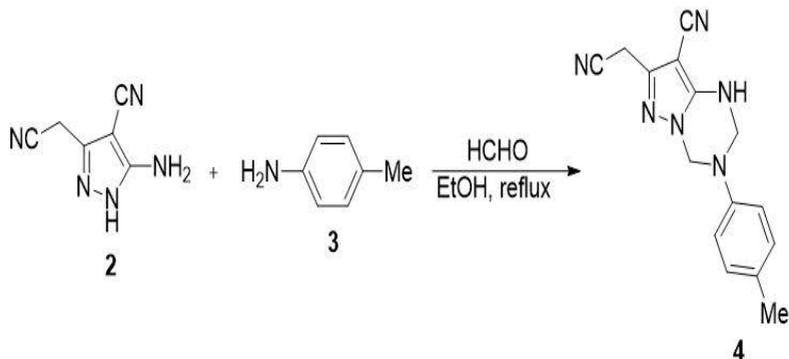


Рис. 2

Таким образом, нами были изучены химические свойства 5-амино-3-(цианометил)-1*H*-пиразол-4-карбонитрила на примере реакции аминометилирования, в ходе которой был получен 3-(4-метилфенил)-7-(цианометил)-1,2,3,4-тетрагидропиразоло[1,5-*a*][1,3,5]триазин-8-карбонитрил и установлено его строение с помощью разнообразных физико-химических методов анализа.

Список литературы

1. Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G., Semenova A.M. Heterocyclization reactions using malononitrile dimer (2-aminopropene-1,1,3-tricarbonitrile) // Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2018. Vol. 54. № 11. P. 989–1019.
2. Dotsenko V.V., Chigorina E.A., Krivokolysko S.G. Synthesis of derivatives of a novel heterocyclic system 7-thia-1,4,6,8-tetraazabenz[de]anthracene // Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2017. Vol. 53. № 5. P. 626–628.
3. Carboni R.A., Coffman D.D., Howard E.D. Cyanocarbon chemistry. XI. Malononitrile dimer // Journal of American Chemical Society. 1958. Vol. 80. P. 2838–2840.
4. Mannich V.C. Eine Synthese von-Ketonbasen // Archiv Der Pharmazie. 1917. Vol. 255. № 4. P. 261–276.
5. Semenova A.M., Organesyan R.V., Dotsenko V.V. et al. Reaction of 5-Amino-3-(cyanomethyl)-1*H*-pyrazole-4-carbonitrile with Hydroxycyclohexanones // Russian Journal of General Chemistry. 2019. Vol. 89. № 1. P. 19–24.

УДК 547.466.1

Кустова Т.П., Кочетова Л.Б.

ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет»,
Иваново, Россия
kustovatp@ivanovo.ac.ru

ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГЛИЦИН-*L*-ЛЕЙЦИНА И ПРОДУКТА ЕГО БЕНЗОИЛИРОВАНИЯ

*С использованием программы PASS Online выполнен компьютерный скрининг биологической активности дипептида глицил-*L*-лейцин (Gly-*L*-Leu) и продукта его бензоилирования по концевой аминогруппе (Bz-Gly-*L*-Leu). Установлено, что у Bz-Gly-*L*-Leu по сравнению с немодифицированным дипептидом немного снижается способность к ингибированию ряда ферментов-гидролаз и заметно уменьшается токсичность.*

Ключевые слова: глицил-*L*-лейцин, биологическая активность, виртуальный скрининг, бензоилирование, дипептиды.

Kustova T.P., Kochetova L.B.
Ivanovo State University,
Ivanovo, Russia

VIRTUAL SCREENING OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF GLYCINE-L-LEUCINE AND ITS BENZOYLATION PRODUCT

Using the PASS Online program, a computer screening of the biological activity of the dipeptide glycyl-L-leucine (Gly-L-Leu) and its benzylation product at the terminal amino group (Bz-Gly-L-Leu) was performed. It has been found that Bz-Gly-L-Leu has a slight decrease in the ability to inhibit a number of hydrolase enzymes and a marked decrease in toxicity compared to the unmodified dipeptide.

Keywords: *glycyl-L-leucine, biological activity, virtual screening, benzylation, dipeptides.*

Пути синтеза, модификации и исследования биологической активности дипептидов в настоящее время являются предметом пристального внимания профессионального научного сообщества. Наша группа на протяжении последних лет занимается изучением реакционной способности в ацилировании биологической активности ряда дипептидов на основе глицина, аланина, тирозина и пролина [1]. Компьютерная оценка спектров биологической активности позволяет определить наиболее перспективные направления изучения фармакологического действия конкретных веществ, а также отфильтровать потенциально опасные молекулы на ранних стадиях исследований. Для виртуального скрининга биоактивности нами использован программный пакет *PASSOnline* [2], который позволяет прогнозировать более 4000 видов биологической активности, включая фармакологические эффекты, молекулярные механизмы действия, специфические токсические и побочные эффекты, взаимодействие с ферментами и метаболическими транспортерами, влияние на экспрессию генов, цитотоксичность для опухолевых и неопухолевых клеточных линий, принадлежность к субстратам и/или метаболитам метаболических ферментов и др. Прогнозирование осуществляется путем анализа отношений структура — активность для обучающего набора, который содержит информацию о структурах и известных видах биологической активности более миллиона молекул. Структура органического соединения представлена в *PASS* с использованием многоуровневых окрестностей дескрипторов атомов; прогнозирование активности новых соединений выполняется наивным байесовским классификатором, а структурно-активные отношения определяются анализом обучающего набора. Программа

PASS Online позволяет спрогнозировать вероятность проявления разных видов биологической активности (P_i) по шкале от 0 до 1.

В настоящей работе выполнено компьютерное прогнозирование биологической активности и токсичности дипептида *Gly-L-Leu* (рис. 1) и продукта его бензоилирования *Bz-Gly-L-Leu* (рис. 2), результаты расчета представлены в таблице.

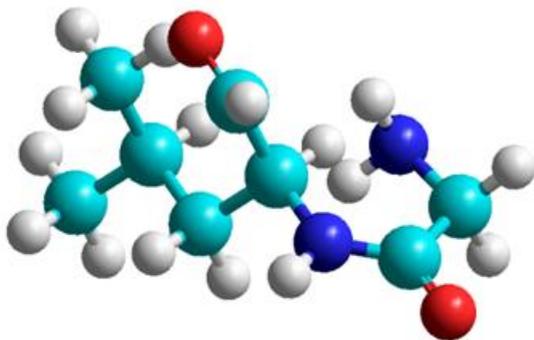


Рис. 1. Модель структуры дипептида *Gly-L-Leu*

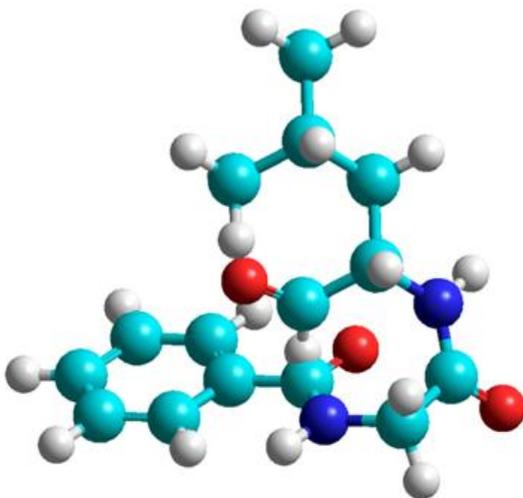


Рис. 2. Модель структуры *Bz-Gly-L-Leu*

Таблица 1. Результаты виртуального скрининга дипептида *Gly-L-Leu* и продукта его бензоилирования *Bz-Gly-L-Leu*

Биологическая активность		
Виды биологической активности	Вероятность проявления биологической активности (P_i)	
	Gly-L-Leu	Bz-Gly-L-Leu
Ингибирование фактора свертывания крови <i>Limulus C</i> (КФ 3.4.21.84)	0,951	0,929
Ингибирование фактора свертывания крови <i>Limulus B</i> (КФ 3.4.21.85)	0,943	0,913
Ингибирование протеинглутамат-метилэстеразы (КФ 3.1.1.61)	0,937	0,889
Ингибирование полипоропепсина (КФ 3.4.23.29)	0,936	0,913
Ингибирование питрилизина (КФ 3.4.24.55)	0,935	0,884
Ингибирование пептидилдипептидазы (КФ 3.4.15.1)	0,934	0,888
Ингибирование энтеропептидазы (КФ 3.4.21.9)	0,933	0,928
Ноотропная активность	0,896	0,902
Виды биологической активности	Вероятность проявления биологической активности (P_i)	
	Gly-L-Leu	Bz-Gly-L-Leu
Ингибирование сахаропепсина (КФ 3.4.23.25)	0,890	0,815
Ингибирование химозина (реннина) (КФ 3.4.23.4)	0,890	0,815
Ингибирование гингипаина К (КФ 3.4.22.37)	0,885	0,768
Ингибирование пироглутамил-пептидазы (КФ 3.4.19.3)	0,871	0,760
Ингибирование митохондриальной промежуточной пептидазы (КФ 3.4.24.5)	0,855	0,737
Ингибирование карбоксипептидазы (КФ 3.4.21.1)	0,853	0,687

Ингибирование псевдолизина (КФ 3.4.24.26)	0,854	0,788
Ингибирование фибролазы (КФ 3.4.24.72)	0,832	0,666
Ингибирование пикорнаина 3С (КФ 3.4.22.28)	0,805	0,739
Ингибирование ациламиноацилпеп- тидазы (КФ 3.4.19.1)	0,803	0,646
Ингибирование трипептидамино- пептидазы (КФ 3.4.11.4)	0,794	0,670
Ингибирование проколлагена С-эндопептидазы (КФ 3.4.24.19)	0,787	0,532
Ингибирование серрализина (КФ 3.4.24.40)	0,780	0,692
Ингибирование катепсина В (КФ 3.4.22.38)	0,759	0,550

Токсичность		
Виды токсических и побочных эффектов	Вероятность проявления побочных и токсических эффектов (P _i)	
	Gly-L-Leu	Bz-Gly-L-Leu
Аллергический контактный дерматит	0,681	0,329
Анемия	0,636	0,300
Угревая сыпь	0,607	0,512
Буллезный пемфигоид	0,567	0,350
Астма	0,534	0,385
Спленомегалия	0,519	0,392
Ретроперитонеальный фиброз	0,515	0,409
Гипергликемия	0,510	0,472
Метгемоглобинемия	0,509	0,520
Истинная эритроцитарная аплазия	0,508	0,663
Нарушение остроты зрения	0,473	0,307
Репродуктивная дисфункция	0,436	0,331
Неврит зрительного нерва	0,435	0,344
Нефротический синдром	0,410	0,349
Скрытое кровотечение	0,398	0,414
Психозы	0,393	0,362

Оптическая нейропатия	0,389	0,305
Депрессия	0,365	0,324
Анорексия	0,358	0,363

Исходя из данных таблицы, можно заключить, что у продукта бензоилирования глициллейцина снижается способность к ингибированию целого ряда ферментов класса гидролаз: протеинглутаматметилэстеразы (КФ 3.1.1.6), который участвует в передаче сигналов в бактериальных клетках; митохондриальной промежуточной пептидазы (КФ 3.4.24.5) — важного фермента, обеспечивающего импорт митохондриальных белков; карбоксипептидазы (КФ 3.4.21.1) — фермента, гидролизующего пептидную связь аминокислотного остатка на С-конце белка; гингипаина К (КФ 3.4.22.37) и фибролазы (КФ 3.4.24.72). Следует отметить, что у бензоилпроизводного *Bz-Gly-L-Leu* немного улучшается ноотропная активность (усиление когнитивных функций организма), работа гомеостаза организма за счет снижения способности к ингибированию ферментов, отвечающих за свертываемость крови, таких как *Limulus C* (КФ 3.4.21.84) и *Limulus B* (КФ 3.4.21.85) и др.

По результатам виртуального скрининга продукт бензоилирования глициллейцина склонен к проявлению побочных эффектов, влияющих на кровеносную систему, например, метгемоглобинемия (повышенное содержание метгемоглобина в крови), эритроцитарная аплазия (анемия, обусловленная сокращением производства красных кровяных клеток в костном мозге), скрытые кровотечения. Также среди токсических эффектов оказались анорексия (расстройство пищевого поведения), ортостатическая гипотензия (резкое снижение АД при изменении положения тела из горизонтального в вертикальное) и гиперхолестеринемия (повышенное содержание холестерина в крови), увеличивающая риски возникновения атеросклероза. Вместе с тем данные расчета дают основание полагать, что при переходе от дипептида к его бензоилпроизводному значительно снизится вероятность возникновения аллергических контактных дерматитов, угревой сыпи, буллезного пемфигоида (хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание кожи) и раздражения кожных покровов. Стоит отметить, что у *Bz-Gly-L-Leu* по сравнению с *Gly-L-Leu* немного снижается вероятность проявления побочных эффектов со стороны нервной системы (депрессии, психозы, паркинсонизм), органов чувств (нарушение остроты зрения, неврит зрительного нерва, оптическая нейропатия), а также репродуктивной и дыхательной систем и др. В целом, можно сказать, что *Bz-Gly-L-Leu* менее токсичен по сравнению с *Gly-L-Leu* и имеет большее

количество положительных влияний на организм, чем побочных эффектов.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что по данным виртуального скрининга *Bz-Gly-L-Leu* — продукт бензоилирования дипептида *Gly-L-Leu* — обладает интересным спектром биологической активности и может рассматриваться как потенциальный лекарственный препарат.

Список литературы

1. Kustova T.P., Kochetova L.B., Khachatryan D.S. Comparison of the reactivities of tyrosine–proline-based dipeptides toward acylation with nitrophenyl benzoates // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2022. V. 58. № 4. P. 422–429. DOI: 10.1134/S1070428022040078.

2. Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the Pass Online web resource // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2014. Vol. 50. № 3. P. 444–457. DOI: 10.1007/s10593-014-1496-1.

УДК 547.787:615.281.873

Лахвич Ф.Ф., Ринейская О.Н.

*Белорусский государственный медицинский университет,
Минск, Республика Беларусь
lakhvichtt@gmail.com, ryneiskaya@mail.ru*

ИЗУЧЕНИЕ АФФИННОСТИ РИВАРОКСОБАНА *IN SILICO* К β -КЕТОАЦИЛ[АСР]СИНТАЗЕ 1

Исследована in silico активность Ривароксобана как представителя оксазолидинонов по отношению к β -кетоацил[АСР]синтазе 1. При помощи методов молекулярного докинга установлены центры связывания Ривароксобана с протенином. Для центра, обеспечивающий наибольшую аффинность Ривароксобана с протенином (-10,26 ккал/моль) были проанализированы 4 кластера числом пробегов более 15.

Ключевые слова: аффинность, β -кетоацил[АСР]синтаза 1, молекулярный докинг, оксазолидиноны, Ривароксбан, фармакофор.

Lakhvich T.T., Ryneiskaya V.M.
Belarusian State Medical University,
Minsk, Republic of Belarus

STUDY OF RIVAROXABAN BINDING AFFINITY TO β -KETOACYL[ACP]SYNTHASE 1

The activity of Rivaroxaban as a representative of oxazolidinones in relation to β -ketoacyl[ACP]synthase 1 was studied in silico. With the help of molecular docking methods, the binding centers of Rivaroxaban with protein have been established. For the center providing the highest affinity of Rivaroxaban with protein (-10.26 kcal/mol), 4 clusters with a large number (from 16 to 23) of repeated interaction positions were analyzed.

Keywords: *affinity, β -ketoacyl[ACP]synthase 1, molecular docking, oxazolidinones, Rivaroxaban, pharmacophore.*

Введение. Актуальной проблемой здравоохранения является рост заболеваний туберкулезом, резистентного как к традиционному лечению лекарственными средствами (ЛС) первого ряда, так и к лечению резервными ЛС [1]. Поиск ингибиторов β -кетоацил[ACP]синтазы I, которая участвует в биосинтезе миколовых кислот — компонента микобактериальной клеточной стенки, открывает возможности для создания новых противотуберкулезных ЛС. Ранее нами было показано в исследовании *in silico* [2], что производные гидроксиизонипекотиновых кислот с транс-диаксиальным расположением гидроксильных групп проявляют выраженную биологическую активность по отношению к природному и мимическому вариантам β -кетоацил[ACP]синтазы I [3]. При этом зависимость влияния заместителей на активность была аналогичной исследованиям *in vitro* по отношению к *Mycobacterium tuberculosis* [2]. Выявление схожей зависимости как *in vitro* так и *in silico*, для комплекса с кодом белка 2WGF позволило использовать данный протеин в поиске структур-кандидатов для дальнейших стадий рационального драг-дизайна. В продолжение исследований нами изучались *in silico* соединения ряда оксазолидинонов [4].

Целью нашей работы является поиск фармакофора, обеспечивающего аффинность Ривароксобана к β -кетоацил[ACP]синтазе, посредством изучения характера взаимодействий лиганда с протеином в пределах основных кластеров.

Материалы и методы. Информация о трехмерной структуре фермента β -кетоацил[ACP]синтазы I (код белка 2WGF, цепь A) получена с сайта Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Для

молекулярного докинга *in silico* использовался ряд специализированных программ: программного пакета ChemOffice, AutoDock Tools 1.5.7 [5], программа OpenBabelGUI, онлайн-серверы Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) и Protein-Plus (<https://proteins.plus>).

AutoDock 4 использовался для подготовки лигандов к стыковке с рецептором, расчета сетки потенциалов и непосредственно лиганд-белковых взаимодействий. При стыковке с целью оптимизации процесса в Autodock использовался генетический алгоритм поиска глобального минимума Ламарка (LGA) с числом прогонов 100, размером популяции 300 для жесткого рецептора и гибкого лиганда. Взаимодействие лиганда и белка оценивалось при помощи характеристик, полученных в результате докинга: энергии связывания ($E_{\text{связ.}}$) и константы ингибирования (K_i). В настоящей работе энергией связывания считали наименьшее значение изменения свободной энергии Гиббса при переходе комплекса лиганд-протеин из несвязанного состояния в связанное. Программа OpenBabelGUI использовалась в качестве конвертера форматов, требуемых AutoDock 4, PLIP и Protein-Plus. Поиск центров связывания, изучение характера взаимодействий лигандов с рецептором производился при помощи онлайн-серверов PLIP и Protein-Plus.

Результаты и их обсуждение. Ривароксабан является производным оксазолидинона и широко используется в настоящее время в качестве антикоагулянта. Ранее нами была показана возможность проявления антимикобактериальной активности производными оксазолидинонов [4].

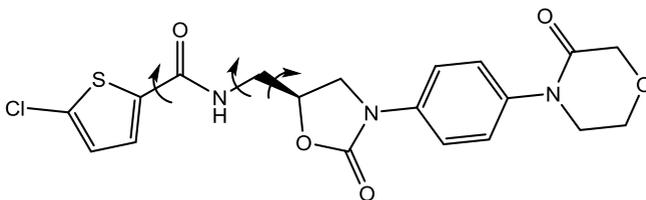
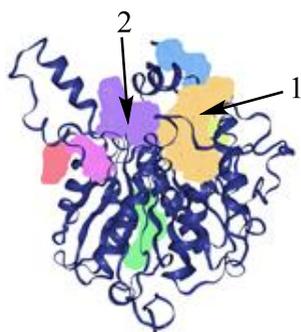


Рис. 1. Структурная формула Ривароксабана: молекула содержит 3 связи, вокруг которых возможно вращение

Чтобы определить, является ли β -кетоацил[АСР]синтаза I мишенью Ривароксабана, нами был проведен «слепой» докинг указанных протеина и лиганда. Было показано наличие 7 карманов, два из которых отличались минимальными энергиями связывания, перспективными для дальнейшего изучения биологической активности; при этом в рам-

ках этих 2 карманов было выделено 33 варианта стыковки. Для комплекса с минимальной энергией связывания были установлены координаты атомов аминокислотных остатков, участвующих в стыковке.



- 1 — основной центр связывания (мин. $E_{св.} = -10,18$ ккал/моль, $K_i = 34,39$ нМ);
 2 — дополнительный центр связывания (мин. $E_{св.} = -8,92$ ккал/моль, $K_i = 288,69$ нМ);

Рис. 2. Вероятные центры связывания β -кетоацил[АСР]синтазы I (цепь А), полученные при помощи онлайн-серверы Protein-Plus

Для детализации характеристик связывания лиганда в активном центре проводился докинг в ограниченной области протеина (ограниченный докинг), центр которой был рассчитан по результатам выше представленных данных: размер $40 \times 40 \times 40$, координаты центра $18,183 \times 33,451 \times 18,084$.

Таблица 1. Показатели, характеризующие кластеры докинга Ривароксабана и β -кетоацил[АСР]синтазы I (2WGF) в ограниченной области

№	Минимальная $E_{связ.}$, ккал/моль	K_i , нМ	Средняя $E_{с.в.яз.}$, ккал/моль	Число пробегов в пределах кластера
1	-10,26	30,05	-9,68	16
2	-9,12	206,53	-8,60	4
3	-9,11	211,28	-9,11	1
4	-9,07	224,32	-8,74	17
5	-8,96	271,88	-8,32	23
6	-8,91	294,93	-8,87	2
7	-8,88	311,72	-8,52	20
8	-8,23	935,00	-8,03	7
9	-8,18	1020	-8,02	6

10	-7,92	1560	-7,92	1
11	7,74	2130	-7,66	2
12	-7,66	2440	-7,66	1

В результате эксперимента были получены показатели, близкие по значению к характеристикам «слепого» докинга с тенденцией к незначительному уменьшению минимальной энергии связывания. Так, минимальное значение энергии связывания для Ривароксабана составило $-10,26$ ккал/моль; $K_i=30,05$ нМ. Ограниченный докинг выявил 12 кластеров, характеризующихся различной конформацией и позицией лиганда по отношению к протеину. Только 9 из них подтверждаются более чем одним прогоном докинга (табл. 1).

Проанализировано 4 комплекса лиганд-протеин (№ 1, 4, 5, 7) с числом пробегов более 15 в пределах кластера: 16, 17, 23 и 20 соответственно.

Большинство типов взаимодействий рассматриваемых комплексов совпадает с результатами «слепого» докинга. Дополнительные взаимодействия не меняют расположения лиганда в карманах и вносят незначительный вклад в общую энергию связывания.

Для кластеров 1 и 4 гидрофобные взаимодействия играют исключительно важную роль в формировании аффинности лиганда к рецептору в пределах. Так, остатки Phe, Ala и Pro для кармана 1 формируют протяженную гидрофобную матрицу, вдоль которой «вытягивается» молекула Ривароксабана. Для кластера 4 добавляется взаимодействие с остатками Met, Val и Ile. Влияние гидрофильных взаимодействий носит вспомогательный характер; так остатки His и Thr обеспечивают специфическую для обоих кластеров ориентацию оксазолидинонового фрагмента. Так, геометрически кластер 4 отличается от кластера 1 поворотом относительно связей между оксазолидиноновым и тиюфеновым фрагментами (остаток His), что приводит к закруглению молекулы Ривароксабана. При этом оксазолидиноновый фрагмент располагается напротив тиюфенового цикла, а оксазиновый фрагмент «высвобождается» из гидрофобного окружения и уходит в противоположную сторону относительно позиции в кластере 1. В кластере 1 гидрофобная матрица «захватывает» молекулу лиганда с обеих сторон бензольного кольца, что, возможно, и приводит к более сильному связыванию с рецептором вытянутой молекулы.

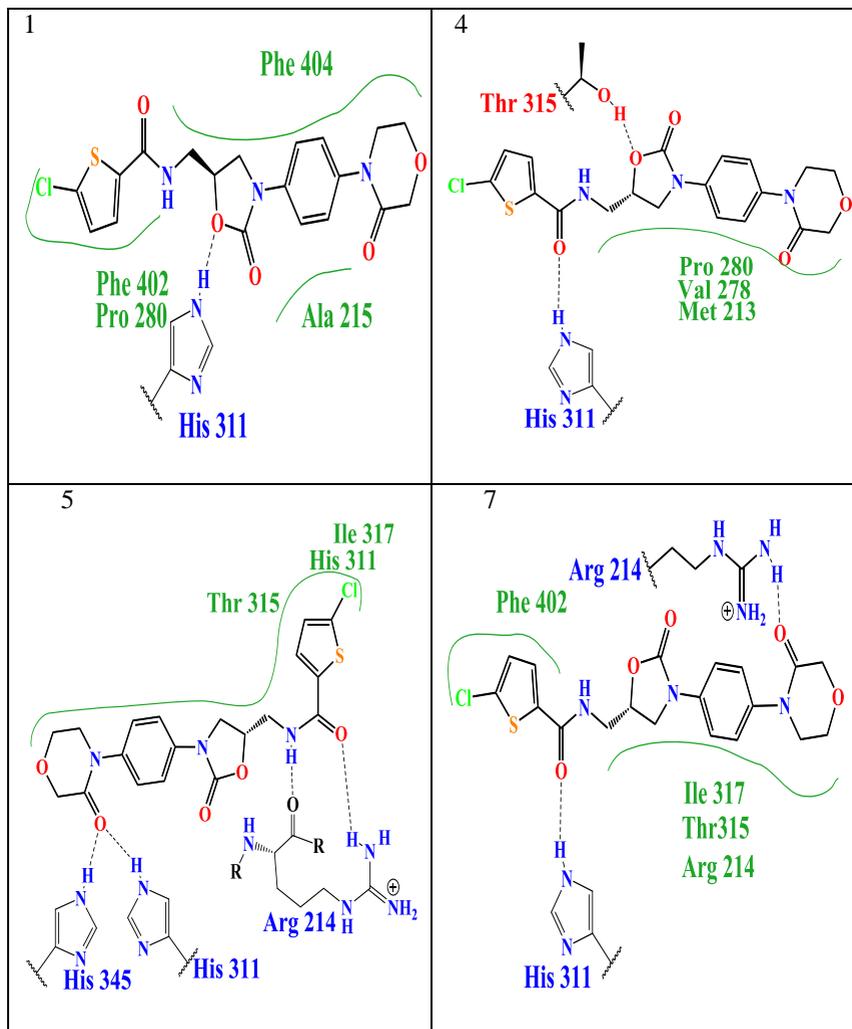


Рис. 3. Типы взаимодействий лиганда с протеином в комплексах, соответствующих кластерам 1, 4, 5, 7 по данным Protein-Plus (2D)

При формировании аффинности кластеров 5, 7 растет роль гидрофильных взаимодействий. Наибольшую роль в формировании этих взаимодействий играет остаток Arg; при этом его вытянутая структура

обеспечивает образование нескольких водородных связей, в которых аминокислота является как донором, так и акцептором водорода. Для этих кластеров также растет роль оксаинонового фрагмента в образовании водородных связей с остатками His или Arg. Следует отметить, что при образовании водородной связи с остатком His в качестве донора протона, последний занимает практически равноудаленную позицию от атомов лиганда и аминокислоты. Это может свидетельствовать о значительном влиянии данного взаимодействия не только на формирование аффинности лиганда к рецептору, но и в механизме возникновения физиологического отклика. В кластерах 1, 4 и 7 лиганд ориентирован однотипно. Можно предположить, что конкретная позиция лиганда в пределах этих кластеров может меняться в рамках реализации одного механизма, обеспечивающего физиологический отклик. При этом можно предположить, что незначительные изменения характеристик среды (например, pH, присутствие ионов и пр.) приведут к переходу от энергетически доминирующего кластера ($E_{\text{связ.}} = -10,26$ ккал/моль; с преимущественно гидрофобными взаимодействиями) к кластеру 7 ($E_{\text{связ.}} = -8,88$ ккал/моль; с выраженным гидрофильным характером взаимодействия). Последнее может быть причиной возникновения физиологического отклика. В кластере 5 лиганд полностью меняет свою ориентацию относительно других кластеров; следовательно, вероятность его равновесной трансформации в другие позиции представляется маловероятной.

Проведенные ранее испытания показали антимикобактериальную активность Ривароксабана *in vitro*. Поэтому результаты нашего исследования с большой степенью вероятности подтверждают реализацию механизма антибактериального действия через ингибирование синтеза миколовых кислот.

Список литературы

1. Leimane V., Riekstina V., Holtz T. et al. Clinical outcome of individualized treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Latvia: a retrospective cohort study // *Lancet*. 2005. № 365(9456). P. 318–326.
2. Лахвич Ф.Ф., Зущик П.Ю., Лихвич А.Ф. Рациональный дизайн модели ациклических аналогов гидроксизонипекотиновых кислот // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики. 2019. № 9. С. 389–399.
3. Luckner S.R. et al. Crystal structures of Mycobacterium tuberculosis KasA show mode of action within cell wall biosynthesis and its inhibition by thiolactomycin // *Structure*. 2009. Vol. 17, № 7. P. 1004–1013.

4. Лахвич Ф.Ф., Борова М.И., Ринейская О.Н. Исследование *in silico* зависимости структура-активность оксазолидинонов в поиске противотуберкулезных лекарственных средств // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сборник научных трудов / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Белорусский государственный медицинский университет. Минск: БГМУ. 2021. Вып. 12. В печати.

5. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility // Computational Chemistry. 2009. № 16. P. 2785–2791.

УДК 547.587.11, 615.284, 615.012.1

Лисовский Д.С., Дударев В.Г.
ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
lisovskij.dmitrij@pharminnotech.com

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ДИАЛКИЛАМИНОЭТИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХЛОРЗАМЕЩЕННОГО САЛИЦИЛАНИЛИДА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВОГЕЛЬМИНТНЫЕ СУБСТАНЦИИ

Были получены диметиламино- и диэтиламиноэтильные производные салициланилидного препарата «Оксиклозанид», применяющегося в ветеринарной практике. Предложены два метода их получения, выбран наиболее рациональный. Для полученных веществ были исследованы физико-химические свойства, доказано их строение спектральными методами.

Ключевые слова: противогельминтные препараты, биодоступность, водорастворимые субстанции, органический синтез.

Lisovsky D.S., Dudarev V.G.
St. Petersburg Chemical Pharmaceutical University,
St. Petersburg, Russia

WATER-SOLUBLE DIALKYLAMINOETHYL DERIVATES OF CHLORO-SUBSTITUTE SALICYLANILIDE IS POTENTIALLY ANTHELMINTIC SUBSTANCES

The dimethylamino- and diethylaminoethyl derivatives veterinary anthelmintic «Oxyclozanide» were synthesized. 2 methods of obtaining them were proposed, the most rational one was selected. Physicochemical

properties were investigated for the obtained substances, their structure was proved by spectral methods.

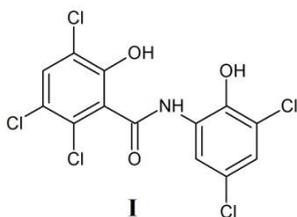
Keywords: *anthelmintic, bioavailability, water-soluble substances, organic synthesis.*

В настоящее время проблема гельминтозов сельскохозяйственных животных стоит достаточно остро. Номенклатура противогельминтных препаратов невелика, что делает проблему разработки и усовершенствования новых препаратов особенно актуальной [1].

Одна из групп противогельминтных препаратов представлена салициланилидами. Препараты данной группы также имеют серьезные недостатки, наиболее значимые из которых — высокая токсичность и низкая биологическая доступность. Низкая биологическая доступность обусловлена в основном малой растворимостью в биологических жидкостях организма [2]. Салициланилиды вводят в организм перорально; из-за низкой растворимости в кишечнике они всасываются очень слабо, наибольшая часть препарата выводится в неизменном виде с калом. Для создания достаточной концентрации для угнетения паразитов приходится вводить большие дозировки вещества. Создание растворимых препаратов позволило бы уменьшить дозы вводимого препарата [3, 4].

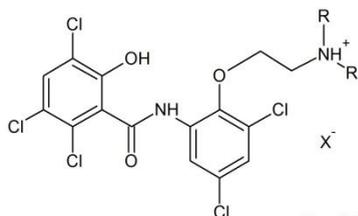
Объекты и методы исследования

Оксиклозанид (*I*) — салициланилидный препарат, используемый для лечения трематодозов и нематодозов животных. Вещество нерастворимо в воде, в организм вводится в виде суспензии, обладает относительно низкой токсичностью по сравнению с аналогами.



Целью работы являлась разработка метода синтеза водорастворимых форм диалкиламиноэтильных производных (*Ia*, *Ib*) оксиклозанида. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи: раз-

работать методы синтеза целевых веществ, выбрать наиболее рациональные из них и исследовать свойства полученных веществ.



IIa

R: CH₃ (IIa)

IIb

R: C₂H₅ (IIb)

Были предложены 2 цепочки, которые ведут к получению искомого веществ. В обоих случаях исходными веществами являлись 2,4-дихлорфенол (ДХФ), 3,5-дихлорсалициловая кислота (ДХСК), 1,2-дихлорэтан.

В соответствии с первым (рис. 1) предложенным способом ДХФ алкилировали избытком 1,2-дихлорэтана при кипении в течение 6-ти часов, получая 1-(2-хлорэтокси)-2,4-дихлорфенол. Его далее обрабатывали избытком водного диметиламина/диэтиламина, получая диметиламиноэтильное/диэтиламиноэтильное производные ДХФ. Полученные продукты нитровали смесью азотной и серной кислот, получая *o*-нитропроизводные. На следующем этапе нитросоединения восстанавливали дитионитом натрия в водном аммиаке, выделяли и сушили полученные амины, которые затем ацилировали хлорангидридом 3,5,6-трихлорсалициловой кислоты с получением искомого амидов. 3,5,6-трихлорсалициловую кислоту получили хлорированием ДХСК в олеуме.

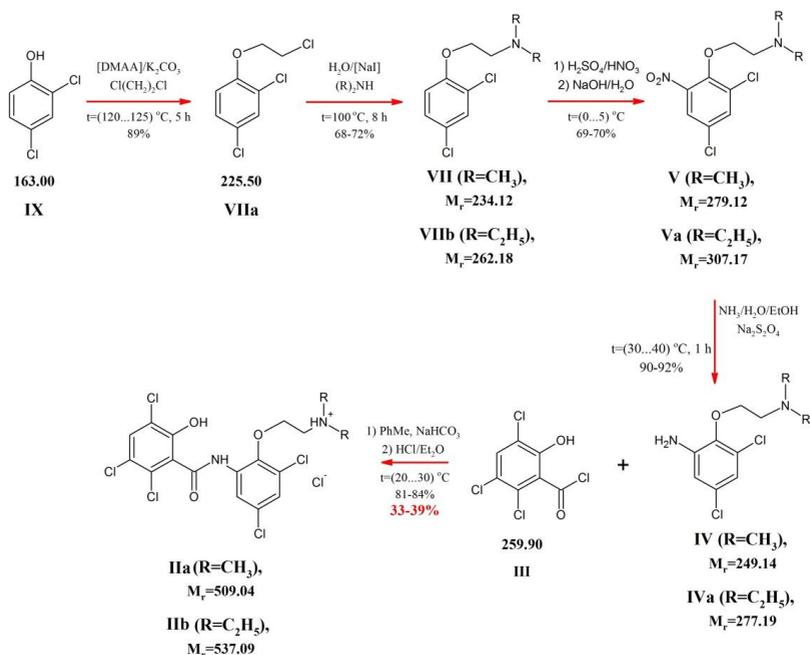


Рис. 1. Первый предложенный способ синтеза

В данном способе реакция нитрования является наиболее «капризной», требующей строгого соблюдения условий выдержки, к тому же, отличающейся невысоким выходом. Было установлено, что реакции алкилирования и нуклеофильной замены галогена (2 стадии) можно проводить в одну, проводя алкилирование N,N-диметил-2-хлорэтиламином/N,N-диэтил-2-хлорэтиламином вместо 1,2-дихлорэтана. Выходы продукта аналогичны тем, которые получены при двухстадийном процессе.

При решении проблемы неселективного алкилирования был разработан второй способ (рис. 2), ведущий к целевым веществам. На первой стадии ДХФ обрабатывали нитрующей смесью, селективно получая 2-нитро-4,6-дихлорфенол, который затем восстанавливали дитионитом натрия в водном аммиаке. Так как дальнейшее алкилирование пойдет не только по фенольному гидроксилу, но и по аминогруппе, вводили ацетильную защиту аминогруппы, обрабатывая 2-амино-4,6-дихлорфенол уксусным ангидридом. Полученный 2-ацетиламино-4,6-дихлорфенол алкилировали в 2 стадии, аналогично предыдущему спо-

субу. Ацетильную защиту снимали, выдерживая продукты в горячей серной кислоте, затем выделяли амины. Амины ацилировали хлорангидридом 3,5,6-трихлорсалициловой кислоты, аналогично предыдущему способу, получая искомые вещества.

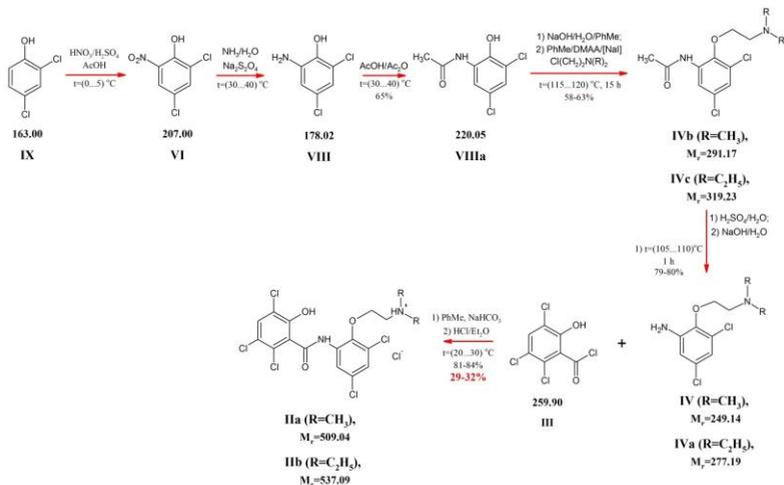


Рис. 2. Второй предложенный способ синтеза

Строение полученных веществ доказывалось спектральными методами: ядерно-магниторезонансной спектроскопией на ядрах ^1H и ^{13}C . Спектры полученных продуктов представлены на рис. 3 и 4 для диметиламиноэтильного производного, рис. 5 и 6 для диэтиламиноэтильного производного. На ^1H NMR спектрах в области слабого поля наблюдаются сигналы амидного протона, в областях 7–8 м.д. наблюдаются сигналы протонов бензольных колец, в области сильного поля наблюдаются сигналы протонов метильных и метиленовых групп. На ^{13}C NMR спектрах при 165 м.д. наблюдаются сигналы атомов углерода карбамидной группы, в слабом поле сигналы атомов углерода бензольных колец, в области сильного поля наблюдаются сигналы атомов углерода алифатических групп.

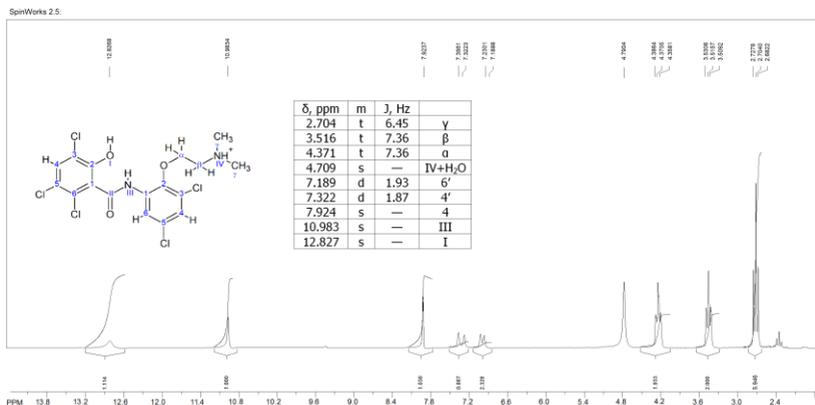


Рис. 3. ¹H ЯМР спектр N-{2-[2-(N,N-диметиламино)этокс]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамида солянокислого (гидрохлорид, D₂O, 400 МГц): δ 12.83 (с; 1H, «OH»), 10.98 (с; 1H, «CONH»), 7.92 (с; 1H, «CH»), 7.32 (д, J 1.87 Гц; 1H, «CH»), 7.19 (д, J 1.93 Гц; 1H, «CH»), 4.71 (с; 1H, «NH»), 4.37 (т, J 7.36 Гц; 2H, «CH₂»), 3.52 (т, J 7.36 Гц; 2H, «CH₂»), 2.70 (т, J 6.45; 6H, «CH₃»)

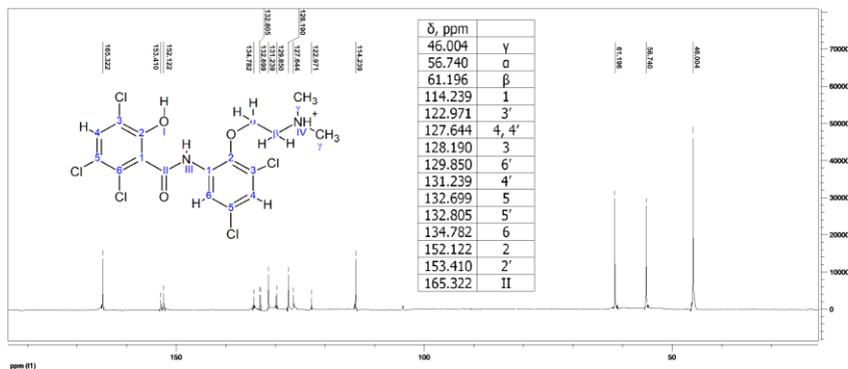


Рис. 4. ¹³C ЯМР спектр N-{2-[2-(N,N-диметиламино)этокс]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамида солянокислого (гидрохлорид, D₂O, 400 МГц): δ 165.32 («CONH»), 153.41 (аром.), 152.12 (аром.), 134.78 (аром.), 132.81 (аром.), 132.70 (аром.), 131.24 (аром.), 129.85 (аром.), 128.19 (аром.), 127.64 (аром.), 122.97 (аром.), 114.24 (аром.), 61.20 («CH₂»), 56.74 («CH₂»), 46.00 («CH₃»)

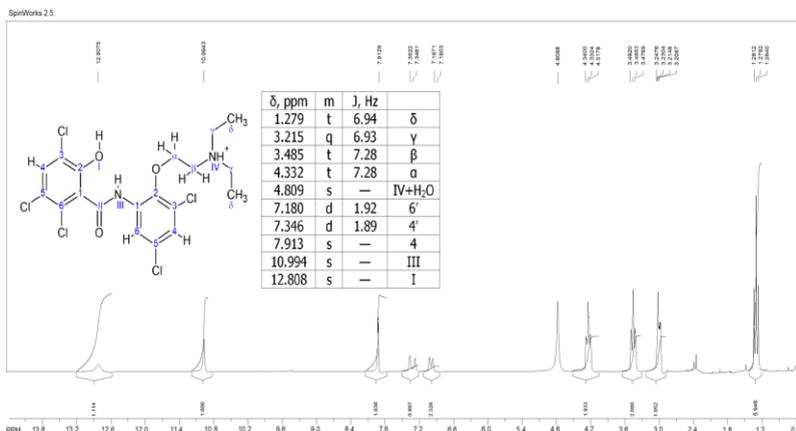


Рис. 5. ^1H ЯМР спектр N-{2-[2-(N,N-диэтиламино)этокс]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамида солянокислого (гидрохлорид, D₂O, 400 МГц): δ 12.81 (с; 1H, «ОН»), 10.99 (с; 1H, «CONH»), 7.91 (с; 1H, «CH»), 7.35 (д, J 1.89 Гц; 1H, «CH»), 7.18 (д, J 1.92 Гц; 1H, «CH»), 4.81 (с; 1H, «NH»), 4.33 (т, J 7.28 Гц; 2H, «CH₂»), 3.49 (т, J 7.28 Гц; 2H, «CH₂»), 3.22 (квадр., J 6.93 Гц; 4H, «CH₂»), 1.28 (т, J 6.94 Гц; 6H, «CH₃)»

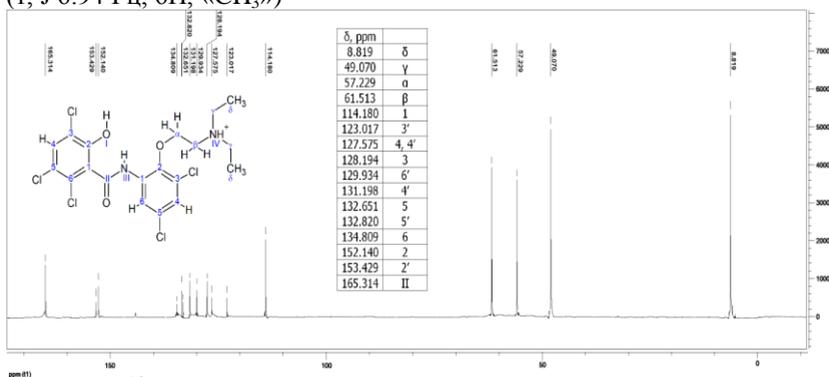


Рис. 6. ^{13}C ЯМР спектр N-{2-[2-(N,N-диэтиламино)этокс]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамида солянокислого (гидрохлорид, D₂O, 400 МГц): δ 165.31 («CONH»), 153.43 (аром.), 152.14 (аром.), 134.81 (аром.), 132.82 (аром.), 132.65 (аром.), 131.20 (аром.), 129.93 (аром.), 128.19 (аром.), 127.58 (аром.), 123.02 (аром.), 114.18 (аром.), 61.53 («CH₂»), 57.23 («CH₂»), 49.07 («CH₂»), 8.82 («CH₃»)»

Для полученных веществ были сняты ИК-спектры, представленные на рис. 7 и 8. На ИК-спектрах при 3500 см^{-1} наблюдается характерный пик поглощения, соответствующий валентным колебаниям амидной группы.

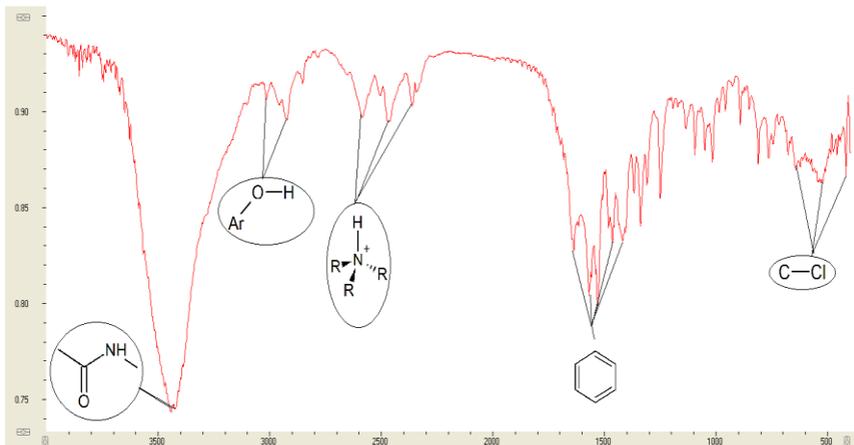


Рис. 7. ИК-спектр N-{2-[2-(N,N-диметиламино)этокси]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамида солянокислого (KBr disc) 3445, 3416 (ν NHCO); 3017, 2922 (ν Ar-O-H); 2583, 2469, 2361 (ν R₃N⁺-H); 1630, 1570, 1529 (δ , γ C-C); 1480, 1465 (δ_s , δ_{as} CH₃, CH₂); 1136, 1095, 1050, 1016 (Ar-O-CH₂); 893, 812, 763 (ν C-Cl)

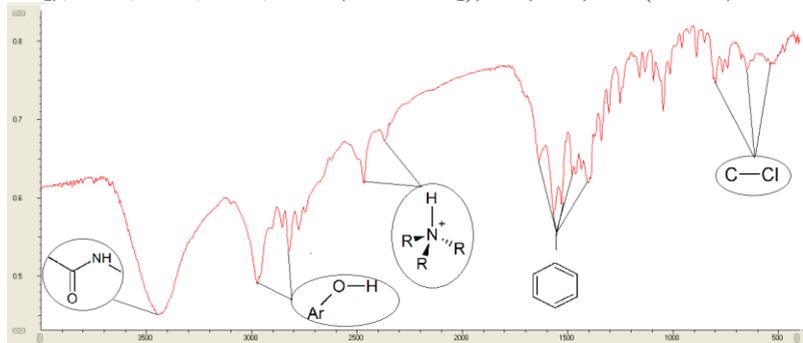


Рис. 8. ИК-спектр N-{2-[2-(N,N-диэтиламино)этокси]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамида солянокислого (KBr disc) 3449 (ν NHCO); 2970 (ν Ar-O-H); 2824 2777, 2467, 2372 (ν R₃N⁺-H); 1635, 1564 (δ , γ C-C); 1480, 1402 (δ_s , δ_{as} CH₃, CH₂); 1342, 1253, 1047 (Ar-O-CH₂); 888, 798 (ν C-Cl)

Результаты и их обсуждение

Для выбора наиболее рациональной методики руководствовались критериями суммарного выхода продуктов и временем синтеза (табл. 1). В качестве наиболее рационального способа был выбран первый, в соответствии с которым были получены диалкиламиноэтильные производные оксиклозанида (N-{2-[2-(N,N-диметиламино)этокси]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамид солянокислый и N-{2-[2-(N,N-диэтиламино)этокси]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамид солянокислый) с выходом 39% (для обоих веществ), длительность 5 стадий синтеза составила суммарно 26 часов.

Таблица 1. Сравнение путей синтеза

Параметр	1-й способ	2-й способ
Общий выход продукта на ДХФ, %	39	32
Количество стадий	5	6
Длительность процесса, ч	26	30

Были исследованы физические свойства полученных веществ. Вещества представляют собой кристаллические порошки белого цвета, растворимые в воде. Растворимость (табл. 2) проверяли в дистиллированной воде, при температурах среды (21 ± 0.5) °C соответствии с методикой, описанной в ОФС «Растворимость» ГФ XIV издания. В соответствии с классификацией, данной в ОФС, полученные вещества являются легко растворимыми в воде [5].

Таблица 2. Растворимость продуктов в воде

Вещество	Название	Объем воды на 1 г субстанции, мл	Растворимость в 100 мл воды, г
Па	N-{2-[2-(N,N-диметиламино)этокси]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамид солянокислый	8,5	12
Пь	N-{2-[2-(N,N-диэтиламино)этокси]-3,5-дихлор}фенил-2-гидрокси-3,5,6-трихлорбензамид солянокислый	7,3	14

Заключение

Были получены водорастворимые диалкиламиноэтильные производные оксиклозанида, был выбран наиболее рациональный метод синтеза, было доказано строение полученных веществ, были исследованы их физические свойства.

Список литературы

1. Давыдова И.В. Гельминтозы, регистрируемые на территории Российской Федерации: эпидемиологическая ситуация, особенности биологии паразитов, патогенез, клиника, диагностика, этиотропная терапия. *Consilium Medicum*. 2017. № 19(8). С. 32–40. DOI: 10.26442/2075-1753_19.8.32-40.

2. Трусов С.Н., Севбо Д.П., Бурякина А.В., Михайлицын Ф.С. Поиск оригинальных, доступных и эффективных антигельминтных средств в ряду салициланилидов и пути снижения их токсичности // Всероссийский форум «Пироговская хирургическая неделя» к 200-летию Н.И. Пирогова Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского. М., 2010. С. 378–384.

3. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Оборотова Н.А. и др. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2(15). С. 52–59.

4. Кожокару А.Ф. Энерготропный и протофорный молекулярный механизм действия салициланилидов на искусственных и нативных мембранных системах // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2019. № 10 (часть 1). С. 11–22.

5. ОФС 1.2.1.0005.15 ГФ XIV. Растворимость: общая фармакопейная статья: Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания: издание официальное: введена в действие Приказом Минздрава России от 31 октября 2018 г. № 749. 2018. С. 542–545.

УДК 541.18

Наронова Н.А., Рюмина А.А., Семенова П.В.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Минздрава России,

Екатеринбург, Россия

edinstvennaya@inbox.ru

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ МОДЕЛЬНОЙ КДС НА ОСНОВЕ ФОСФАТА КАЛЬЦИЯ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

В статье изложены результаты определения величины светопропускания методом спектрофотометрии в модельной системе на основе фосфата кальция. Проведена качественная оценка устойчивости коллоидно-дисперсной системы ротовой жидкости в присутствии реминерализующих средств.

Ключевые слова: *коллоидно-дисперсная система, ротовая жидкость, реминерализующие средства, спектрофотометрия.*

Naronova N.A., Ryumina A.A., Semyonova P.V.

Ural State Medical University,

Ekaterinburg, Russia

EVALUATION OF THE STABILITY OF A CALCIUM PHOSPHATE-BASED MODEL CDS BY THE CHEMICAL METHOD OF SPECTROPHOTOMETRY

The article describes the definitions of the results of measurement of light transmission by spectrophotometry in a model of a system based on calcium phosphate. A qualitative assessment of the state of the colloid-dispersed system of oral fluid in suitable remineralizing agents was carried out.

Keywords: *colloid-dispersed system, oral fluid, remineralizing agents, spectrophotometry.*

Современные исследования [1–4] показывают, что ротовая жидкость является коллоидно-дисперсной системой (КДС) и имеет мицеллярное строение. Веществом дисперсной фазы (нерастворимым «ядром» коллоидной системы) в ротовой жидкости является фосфат кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [1]. Ионы стабилизаторов избирательно адсорбируются на поверхности кристаллов согласно правилам Панета–Фаянса. Фосфат кальция взаимодействует с ионами потенциалопределяющего электролита гидрофосфата HPO_4^{2-} , находящегося в водной фазе с избытком. Ионы кальция Ca^{2+} выступают в качестве противоионов

(рис. 1). Белки, входящие в состав ротовой жидкости выступают в роли стабилизаторов, поэтому коллоидный раствор приобретает вязкость, а мицелла КДС стабилизируется [2].

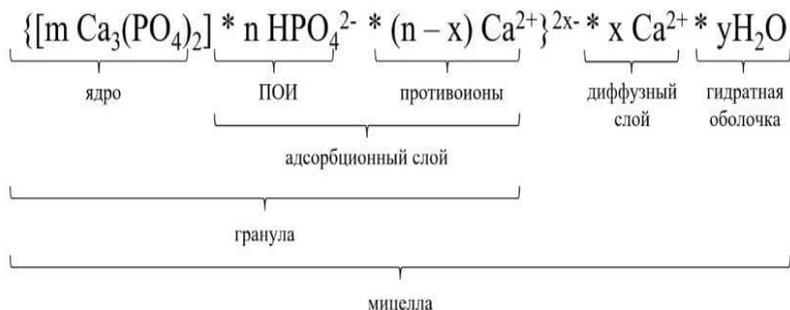


Рис. 1. Строение мицеллы слюны

Поскольку любая КДС, в том числе и ротовая жидкость, агрегативно не устойчива, то под действием различных факторов, таких как изменение концентрации компонентов, изменение температуры, механическое воздействие приводит к процессу коагуляции — укрупнению частиц под действием внешних условий [6]. Например, при изменении рН, КДС ротовой жидкости претерпевает следующие изменения: в кислой среде происходит переход моногидрофосфата в дигидрофосфат ион, тем самым меняется заряд гранулы, а ротовая жидкость, содержащая в своем составе дигидрофосфат кальция, не поддерживает постоянство эмали за счет процесса реминерализации [1, 6]. Наоборот же, в щелочной среде — образуется $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, благодаря которому активно начинает развиваться процесс камнеобразования [2].

Одним из факторов, наиболее сильно влияющим на устойчивость КДС ротовой жидкости, является реминерализующее средство. Компоненты реминерализующего средства способствуют насыщению ротовой жидкости ионами кальция и фосфора, что способствует замещению дефектов в кристалле апатита эмали зуба [7], что и обуславливает минерализующую функцию ротовой жидкости [8].

Ионы кальция адсорбируются на мицелле КДС ротовой жидкости, создают адсорбционный и диффузный слой, тем самым меняя ее устойчивость. Понимание данных процессов позволит оценить механизмы поддержания и нарушения гомеостаза в системе «эмаль зубов— ротовая жидкость».

Метод спектрофотометрии как один из современных и наиболее эффективных методов был использован для оценки влияния реминерализирующих средств на устойчивость КДС ротовой жидкости.

Цель исследования. Определить величину светопропускания в модельной системе КДС ротовой жидкости на основе фосфата кальция, оценить изменение данного показателя в результате изменения устойчивости КДС с течением времени и под воздействием реминерализирующих средств.

Методика эксперимента. К 15 мл раствора хлорида кальция (CaCl_2) с концентрацией $C=2,5 \times 10^{-3}$ М добавили 30 мг реминерализирующего геля (опыт 1 — «R.O.C.S Medical Minerals», опыт 2 — «Белгель»), измерили величину светопропускания (T , %) при $\lambda=420$ нм в кювете на 10 мм.

Затем постепенно добавляли раствор дигидрофосфата калия (K_2HPO_4) с концентрацией $C=2,5 \times 10^{-3}$ М с шагом по 0,5 мл и измеряли величину светопропускания (T , %) полученного раствора.

В контрольном опыте измеряли величину светопропускания раствора, полученного при постепенном добавлении раствора дигидрофосфата калия (K_2HPO_4) к раствору хлорида кальция (CaCl_2) без добавления реминерализирующего геля.

Результаты и их обсуждение

При постепенном добавлении дигидрофосфата калия к избытку хлорида кальция происходит образование модельной системы КДС ротовой жидкости на основе фосфата кальция (контрольный опыт). С помощью метода спектрофотометрии фиксируем постепенное снижение величины светопропускания в водном растворе ($\Delta T=5,4$).

Введение реминерализирующего средства (опыт 1 — «R.O.C.S Medical Minerals», опыт 2 — «Белгель») в исследуемую систему способствует более быстрому насыщению системы, входящими в состав ионами, которые избирательно входят в состав адсорбционного и диффузного слоев, а следовательно, формирование КДС ротовой жидкости идет быстрее (опыт 1 — «R.O.C.S Medical Minerals» $\Delta T=9,5$ и опыт 2 — «Белгель» $\Delta T=8,0$). Результаты определения величины светопропускания в модельной системе КДС ротовой жидкости на основе фосфата кальция представлены в табл. 1 и рис. 2.

Таблица 1. Данные величины светопропускания модельной системы КДС ротовой жидкости на основе фосфата кальция (без и в присутствии реминерализирующего геля)

Раствор без геля		Раствор геля «R.O.C.S»		Раствор геля «Белгель»	
V (KH ₂ PO ₄), мл	T, %	V (KH ₂ PO ₄), мл	T, %	V (KH ₂ PO ₄), мл	T, %
0,0	100,0	0,0	96,9	0,0	98,3
0,5	99,9	0,5	96,8	0,5	98,3
1,0	99,7	1,0	96,9	1,0	97,5
1,5	99,5	1,5	96,2	1,5	96,9
2,0	99,4	2,0	96,1	2,0	96,3
2,5	99,3	2,5	95,3	2,5	96,4
3,0	98,8	3,0	95,3	3,0	95,8
3,5	98,4	3,5	95,1	3,5	95,0
4,0	98,2	4,0	94,6	4,0	95,1
4,5	98,3	4,5	94,6	4,5	94,8
5,0	97,6	5,0	94,2	5,0	94,2
5,5	97,4	5,5	93,7	5,5	93,4
6,0	97,2	6,0	92,8	6,0	93,3
6,5	96,6	6,5	91,5	6,5	92,5
7,0	96,5	7,0	91,2	7,0	92,6
7,5	96,4	7,5	90,9	7,5	91,8
8,0	96,1	8,0	90,6	8,0	91,9
8,5	95,5	8,5	89,7	8,5	91,5
9,0	95,5	9,0	88,0	9,0	91,3
9,5	95,2	9,5	87,3	9,5	90,5
10,0	94,6	10,0	87,4	10,0	90,3

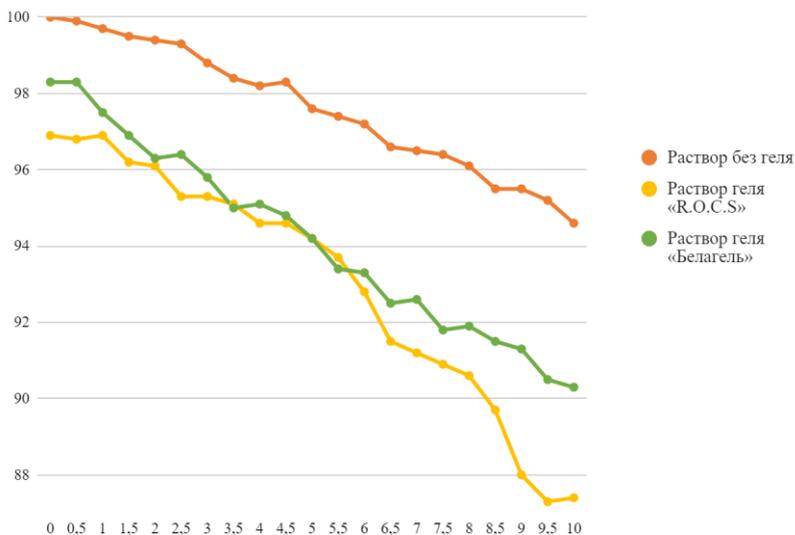


Рис. 2. Зависимость величины светопропускаемости модельной системы КДС ротовой жидкости на основе фосфата кальция (Т, %) от концентрации фосфата кальция.

Величина светопропускания модельной системы КДС ротовой жидкости на основе фосфата кальция в присутствии реминерализующих средств уменьшается в 1,76 раз и 1,48 раза быстрее, чем в контрольном опыте. При этом ионы (например, кальция), входящие в состав реминерализующего средства «R.O.C.S Medical Minerals» быстрее адсорбируются на ядро КДС ротовой жидкости в 1,19 раза, чем ионы, входящие в состав реминерализующего средства «Беллагель».

Выводы

1. Присутствие в системе реминерализующего средства способствует формированию модельной системы КДС ротовой жидкости на основе фосфата кальция.

2. В состав реминерализующего средства «R.O.C.S Medical Minerals» входят ионы, которые быстрее адсорбируются на ядро модельной системы КДС ротовой жидкости на основе фосфата кальция, в сравнении с ионами, входящими в состав реминерализующего средства «Беллагель».

Список литературы

1. Еловикова Т.М., Григорьев С.С. // Слюна как биологическая жидкость и ее роль в здоровье полости рта: учебное пособие. Екатеринбург: ИД «Тираж». 2018. 136 с.
2. Дзарасова М.А., Неелова О.В. Специфические свойства и функции слюны как минерализующей жидкости // Международный студенческий научный вестник. 2017. № 4 (часть 6). С. 945–948.
3. Дзарасова М.А., Неелова О.В. Химический состав слюны и ее физико-химические свойства.
4. Доменюк Д.А., Ташуева Л.В. Оценка сроков адаптации при использовании съемной ортодонтической аппаратуры у детей по биохимическим показателям ротовой жидкости // Кубанский научный медицинский вестник. 2012. С. 134–137.
5. Ермишина Е.Ю., Белоконова Н.А. Химия. Часть 1. Учебно-методическое пособие по общей химии для самостоятельной работы и подготовки к зачету: учебное пособие для студентов I курса всех факультетов. Екатеринбург, УГМА, 2013.
6. Елесина В.В., Верещагин А.Л., Балабанова С.С. Седиментационный анализ суспензий и эмульсий: методические рекомендации к выполнению лабораторных работ по дисциплинам: «Дисперсные системы и поверхностные явления» специальностей 240301.65, 240302.65, 240305.65; «Коллоидная химия» направления подготовки 240700.62; «Физическая и коллоидная химия» направлений подготовки 260100.62, 151000.62; «Физколлоидная химия» направления подготовки 100800.62 всех форм обучения. Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та. 2014. 44 с.
7. Наронова Н.А., Рюмина А.А., Семенова П.В. Определение кальциево-фосфорного соотношения в водных растворах зубных паст. Сборник Modern science and technology: сборник. Петрозаводск, 2020. 165 с.
8. Дзарасова М.А., Неелова О.В. Химический состав слюны и ее физико-химические свойства // Материалы IX Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум».

УДК 615.322:582

**Нечаева Е.А., Повыдыш М.Н., Кириллова Н.В.,
Спасенкова О.М., Ильченко А.С.**

*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
biochemistry_dept@pharminnotech.com*

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ШАЛФЕЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО (*SALVIA OFFICINALIS L.*) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

*Определено присутствие различных групп фенольных соединений в каллусной культуре и высушенных листьях шалфея лекарственного (*Salvia officinalis L.*). Изучены некоторые качественные и количественные показатели биологически активных соединений исследуемого сырья.*

Ключевые слова: шалфей, каллусные культуры, флавоноиды, хлорогеновая кислота, дубильные вещества, рутин.

**Nechaeva E.A., Povydysh M.N., Kirillova N.V.,
Spasenkova O.M., Ilchenko A.S.**

*FSBTI «St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University»
Ministry of Health of the Russian Federation,
St. Petersburg, Russia*

INVESTIGATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF MEDICINAL SAGE (*SALVIA OFFICINALIS L.*) IN CULTURE IN VITRO

*The presence of various groups of phenolic compounds in callus culture and dried leaves of sage (*Salvia officinalis L.*) was determined. Some qualitative and quantitative indicators of biologically active compounds of the investigated raw materials have been studied.*

Keywords: sage, callus cultures, flavonoids, chlorogenic acid, tannins, rutin.

Полукустарник семейства яснотковых (*Lamiaceae*) шалфей лекарственный (*Salvia officinalis L.*), а также препараты на его основе широко используются в настоящее время в традиционной и официальной медицине в качестве антимикробных, противоопухолевых, антиоксидантных, антиканцерогенных, противовоспалительных, антимикробных, спазмолитических, нейропротекторных и антидиабетических средств [1, 2]. Растительное сырье «Шалфея лекарственного листа»

включено в Государственную фармакопею Российской Федерации [3]. Достаточно широкий спектр их физиологического воздействия обусловлен помимо эфирного масла, как основной группы вторичных метаболитов, также высоким содержанием фенольных соединений [4, 5].

Разработка условий получения биологически активных соединений фенольной природы (флавоноидов, фенольных кислот, кумаринов, дубильных веществ) из разных видов природного сырья представляет большой интерес.

Фенольные соединения принимают участие в процессах нейтрализации активных форм кислорода и окислительно-восстановительных реакциях [6]. Механизм действия флавоноидов схож с действием антиоксидантов, обрывающих свободнорадикальные процессы. Они могут отдавать свои электроны, превращая тем самым радикал, в молекулярный продукт, а сами при этом превращаются в слабый феноксил-радикал, не способный участвовать в продолжении цепной реакции [7]. Одним из основных показателей биологической ценности растительного сырья является содержание в нем биофлавоноидов.

Культура растительных клеток и тканей является альтернативным источником получения биологически активных веществ, которые являются физиологически и экологически безопасными. Синтез вторичных метаболитов в культуре клеток и тканей, полученных *in vitro*, используют в фитобиотехнологии наравне с клетками интактных растений. Введение в культуру клеток новых растительных объектов и изучение вторичного метаболизма новых культур продолжает оставаться значимым направлением для оценки их использования в фармацевтической промышленности [8].

Целью исследования было определение качественного и количественного состава основных биологически активных веществ каллусной культуры клеток и листьев шалфея лекарственного.

В качестве объектов исследования использовали лиофильно высушенные культуры клеток и высушенные листья шалфея лекарственного. Экстракцию проводили на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 20 минут, в качестве экстрагента использовали 70% спирт этиловый. Присутствие флавоноидов в извлечениях из сырья и каллусной культуре устанавливали с помощью общепринятых качественных реакций. Присутствие фенольных соединений определяли методом одномерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Sorbfil» в системе *n*-бутанол-уксусная кислота-вода 4:1:2. В качестве стандартных образцов использовали спиртовые растворы ру-

тина, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, гиперозида, лютеолина, апигенина.

Содержание гидроксикоричных кислот определяли ФС.2.5.0019.15 «Крапивы двудомной листья» в пересчете на хлорогеновую кислоту. Оптическую плотность исследуемого раствора спектрофотометре СФ-2000, при длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм [8]. В качестве раствора сравнения использовали спирт 96 %. Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)}$$

где А — оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при 330 нм, равный 507;

а — навеска сырья, г;

W — влажность сырья, %.

Количественное определение флавоноидов проводили по стандартной методике в пересчете на рутин. Оптическую плотность раствора измеряли на фотоэлектроколориметре В-1200 ТМ В-1200 ECOVIEW, при длине волны 440 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве сравнения раствор, состоящий из 0,5 мл извлечения, доведенного в кювете до метки 40% этиловым спиртом. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 25 \cdot 100}{m} \cdot \frac{100}{100 - w}$$

где С — содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в 0,5 мл колориметрируемого раствора, найденное по калибровочному графику, в мг/мл;

m — масса сырья в граммах;

w — влажность сырья, %.

Установлено наличие флавоноидов и дубильных веществ в водно-спиртовых извлечениях сырья и каллусных культур шалфея лекарственного.

Результаты цианидиновой пробы выявили красное окрашивание в пробирке, содержащей извлечения сырья, и розово-оранжевое в пробирке с извлечениями каллусной культуры, что говорит о значительном содержании количества флавоноидов в сырье и меньшем в каллусной культуре.

При добавлении к фильтратам раствора FeCl_3 наблюдали темно-зеленое окрашивание в обеих пробирках, что свидетельствует о наличии флавоноидов с орто-диоксигруппировкой в кольце.

Добавление к фильтратам AlCl_3 вызвало появление лимонно-желтого окрашивания в пробирке с экстрактом сырья, а в пробирке с каллусной культурой видимых изменений не произошло, что говорит о наличии флавоноидов, содержащих в положении C_3 , C_5 OH-группу, в извлечениях сырья и об их отсутствии или незначительном содержании в извлечениях каллусной культуры.

Желтое окрашивание при добавлении к фильтратам раствора NaHCO_3 позволило предположить наличие флавонов, флавонолов, флаванонов и флаванололов в обоих образцах.

По результатам ТСХ-анализа в исследуемом сырье шалфея лекарственного установлено наличие 6 пятен, в извлечении каллусной культуры — 3. Сопоставление величин R_f и характера флюоресценции пятен позволило идентифицировать в траве и каллусной культуре рутин (пятно № 4) и хлорогеновую кислоту (пятно № 3). Результаты ТСХ-анализа представлены в табл. 1.

Предварительно установленное наличие хлорогеновой кислоты и рутина в исследуемом материале позволило проводить анализ суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот в пересчете на соответствующие соединения.

Установлено, что содержание гидроксикоричных кислот в листьях составляет $6,22 \pm 0,03\%$, а в культуре — $4,45 \pm 0,02\%$ а сумма флавоноидов в листьях составила $1,08 \pm 0,01\%$, в культуре — $0,64 \pm 0,02\%$.

Обширный спектр биологической активности и особенности действия препаратов из природного растительного сырья являются основными преимуществами для их широкого применения. В настоящее время из растительного сырья получают более трети всех известных лекарственных субстанций. Структура многих из них настолько сложна, что растения еще долго будут единственным источником их получения.

Таблица 1. Результаты ТСХ-анализа

№ пят на	Окраска пятен		Значение Rf соединения
	видимый свет	УФ	
Извлечения сырья			
1	Светло-желтая	Коричневая	0,28 Флавоноид
2	Светло-желтая	Коричневая	0,42 Флавоноид
3	Желтая	Голубая	0,55 Хлорогеновая кислота
4	Светло-желтая	Коричневая	0,58 Флавоноид
5	Серо-коричневая	Желто-серая	0,80 Рутин
6	Светло-коричневая	Желто-коричневая	0,86 Флавоноид
Извлечения каллусной культуры			
1	Светло-желтая	Голубая	0,55 Хлорогеновая кислота
2	Светло-желтая	Желтая	0,61 Флавоноид
3	Желто-коричневая	Желто-серая	0,80 Рутин

Таким образом, установлено наличие в сырье и каллусной культуре шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) не менее 5 компонентов флавоноидной природы, основными из которых являются рутин и гидроксикоричные кислоты (в пересчете на хлорогеновую кислоту). Определено содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот. Выявлена возможность использования каллусных культур как альтернативного источника ценных биологически активных веществ.

Список литературы

1. Amorati R., Foti M., Valgimigli L. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013. Vol. 61. No 46. P. 10835–10847.
2. Mannelli L.D.C., Micheli L., Maresca M., Cravotto G. et al. // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. No 34832. P. 1–15.
3. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Т. 3. ОФС.2.5.00051.15 «Лекарственное растительное сырье, фармацевтические субстанции растительного происхождения». [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/record/pharmacopea14/> [Дата обращения — 07.09.2022].
4. Jambor T., Arvay J., Ivanisova E., Tvrda E., Kovacik A., Greifova H., Lukac N. Investigation of the properties and effects of *Salvia officinalis* L.

on the viability, steroidogenesis and reactive oxygen species (ROS) Production in TM3 Leydig cells *in vitro* // Physiological Research 69. 2020. P. 661–673.

5. Ghorbani A., Esmaeilizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components // Journal of Traditional and Complementary Medicine. 2017. P. 433–440.

6. Dziurzynski T., Ludwiczuk A., Glowniak K. // Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2013. Vol. 26. No 3. P. 326–330.

7. Bahadori M., Salehi P., Sonboli A. // International Journal of Food Properties. 2017. Vol. 20. No 12. P. 2974–2981.

8. Thomas Efferth. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures // Engineering. 2019. P. 50–59.

9. Крапивы двудомной листья. ФС.2.5.0019.15. *Urticae dioicae folia*. Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 25. (изм. № 1 от 14.11.1996).

УДК 663.86; 616.31

Подюков Е.И., Голицына К.О.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,

Екатеринбург, Россия
egor.podyukov@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ШИПУЧИХ ТАБЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ЦИТРАТ ЦИНКА, НА МОДЕЛЬ ЗУБНОЙ ЭМАЛИ

В статье рассмотрено воздействие растворов шипучих таблеток цитрата цинка на модель зубной эмали, а также воздействие данных растворов на физико-химические показатели ротовой жидкости. Сделан вывод о том, что водные растворы биодобавок оказывают негативное влияние на полярный адсорбент мел (модель зубной эмали). Растворы биодобавок следует рассматривать как агрессивные препараты, после которых необходима нормализация.

Ключевые слова: *зубная эмаль, цинк, биодобавка, лимонная кислота, цитрат цинка.*

Podukov E.I., Golitsyna K.O.

*Ural state medical university of the Ministry of Health
of the Russian Federation,
Ekaterinburg, Russia*

STUDY OF THE ZINC CITRATE EFFERVESCENT PILLS ON TOOTH ENAMEL MODEL

The article considers the effect of solutions of zinc citrate effervescent tablets on the model of tooth enamel, as well as the effect of these solutions on the physicochemical parameters of the oral fluid. It is concluded that aqueous solutions of bioadditives have a negative effect on the polar adsorbent chalk (model of tooth enamel). Dietary supplement solutions should be considered as aggressive preparations, after which normalization is necessary.

Keywords: *tooth enamel, zinc, bioadditive, citric acid, zinc citrate.*

Актуальность. Согласно данным ВОЗ дефицит цинка встречается у более чем 2 млрд человек по всему миру [2]. С целью коррекции дефицита цинка врачи часто назначают пациентам различные биодобавки. На эффективность всасывания цинка при приеме биодобавок влияет биодоступность применяемого соединения, дозировка, а также входящие в состав другие микроэлементы. Согласно данным литературы [4] органические соли цинка обладают лучшей биодоступностью по сравнению с неорганическими формами (сульфатом и оксидом). В биодобавках цинк часто встречается в виде соли лимонной кислоты — цитрата. Цитрат-ион способствует более эффективному транспорту цинка внутрь клеток посредством специальных цитратных ионно-транспортных каналов, что обеспечивает данной форме цинка высокую биодоступность [5].

Помимо разнообразия соединений цинка, варьируются и лекарственные формы: биодобавки с цинком существуют в виде таблеток, пастилок и таблеток для рассасывания, а также шипучих таблеток.

Такая лекарственная форма, как шипучая таблетка, очень популярна за счет приятных органолептических показателей. Однако ее серьезным отличием от твердых таблеток является время контакта с тканями полости рта. При глотании твердой таблетки целиком ее время контакта составляет несколько секунд, в то время как для принятия 200 мл раствора шипучей таблетки требуется больше времени. В этом случае есть смысл рассмотреть влияние растворов на физико-химические показатели ротовой жидкости и зубную эмаль. Существу-

ют рекомендации по приему цитрата цинка для его оптимального усвоения, которые учитывают время приема (принимать на пустой желудок, за 1 час до еды или через 2 часа после еды), взаимодействие его с продуктами питания (во время приема избегать употребления молочных продуктов и продуктов с высоким содержанием клетчатки) и другими лекарственными препаратами [6]. Но в них не рассматривается возможное воздействие растворов шипучих таблеток на ткани полости рта и не дается в связи с этим никаких специальных указаний по их приему.

Цель исследования: изучить воздействие растворов шипучих таблеток цитрата цинка на модель зубной эмали.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования были выбраны биодобавки Цинкит и Цинк без сахара. В обеих биодобавках цинк содержится в виде цитрата. В одной таблетке Цинка без сахара содержится 25 мг элементного цинка (что соответствует рекомендуемой суточной норме), а в одной таблетке цинкита — 10 мг. Важно отметить, что в Цинките цинк содержится в виде сульфата, а в качестве основного компонента на первом месте в составе указывается лимонная кислота. При растворении в воде оба вещества диссоциируют и образуется цитрат цинка. Объем дистиллированной воды для приготовления растворов исследуемых биодобавок брали согласно рекомендациям производителей — 200 мл. Водородный показатель приготовленных растворов определяли на приборе «рН-150 МИ», удельную электропроводность — на кондуктометре «Анион 7020». Содержание цинка в приготовленных растворах определяли трилонометрическим методом. В качестве модели зубной эмали использовали мел. Для оценки воздействия растворов исследуемых биодобавок осуществляли адсорбцию растворов, приготовленных из одной шипучей таблетки. К 30 мл раствора добавляли 0,3 г мела, перемешивали в течение 10 минут, затем фильтровали через фильтр Желтая лента. В фильтрате после адсорбции определяли величину водородного показателя и удельной электропроводности и сравнивали со значениями этих величин до адсорбции. Результаты измерений представлены в табл. 1.

Результаты и их обсуждение. Время растворения таблеток в 200 мл теплой воды составило 4 минуты. Содержание цинка в приготовленных растворах, определенное трилонометрическим методом соответствовало заявленному производителями. В случае с Цинком без сахара столкнулись с трудностями — из-за желтого цвета раствора переход окраски в точке эквивалентности был не из винно-красного в синий согласно методике, а из коричневого в изумрудно-зеленый. Предварительно проводилась качественная реакция на наличие ионов цинка

$3Zn^{2+} + 2K_3[Fe(CN)_6] \rightarrow Zn_3[Fe(CN)_6]_2 \downarrow + 6KCl$, но в растворах обеих биодобавок образования характерного желтого осадка гексацианоферрата цинка не наблюдалось, что говорит о высокой прочности цитратного комплекса.

Таблица 1.

Биодобавка	pH до адсорбции	Электропроводность до адсорбции	pH после адсорбции	Электропроводность после адсорбции	Вк, ммоль/л	Во, ммоль/л
Цинкит	4,6	10,3	6,6	2,4	0,0053	0,00026
Цинк без сахара	4,8	5,5	6	6,3	0,043	0,06

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что растворы обеих биодобавок имеют достаточно низкое значение pH. Растворение зубной эмали происходит при ее контакте с растворами, pH которых 5,5 и менее. Следовательно, растворы обеих обследуемых биодобавок будут вызывать растворение зубной эмали и ее деминерализацию. В ряде исследований [7] установлено, что лимонная кислота вызывает эрозию и снижение микротвердости зубной эмали. В этом отношении наибольшую опасность для зубной эмали представляет Цинкит, так как в нем лимонная кислота содержится в свободном виде и большом количестве, в отличие от биодобавки «Цинк без сахара». Следует отметить, что, несмотря на это, растворы обеих биодобавок имеют довольно близкие значения pH, это может быть вызвано наличием в составе цинк без сахара различных компонентов, влияющих на кислотность раствора.

После адсорбции на меле в растворах обеих биодобавок наблюдается повышение pH: у Цинкита на 2 единицы, а у цинка без сахара на 1,4, что говорит об адсорбции катионов водорода и их взаимодействии с сорбентом, и, тем самым подтверждает вывод о деминерализующем воздействии растворов на мел.

Значение удельной электропроводности у цинкита существенно выше, чем у биодобавки цинк без сахара, что обусловлено различием в

их составе, которое упоминалось ранее. Цитрат цинка в Цинке без сахара диссоциирует хуже, чем сульфат цинка в Цинките.

После адсорбции на меле в растворах обеих биодобавок также наблюдается снижение величины электропроводности, что говорит о возможной адсорбции ионов цинка на меле, а, следовательно, о меньшем их поступлении в ЖКТ. Дополнительно определили буферную емкость растворов исследуемых биодобавок по кислоте и по щелочи с целью оценить влияние этих растворов на свойства ротовой жидкости. В норме значение рН слюны составляет от 6,5 до 7,3. Регуляция кислотно-основного равновесия полости рта осуществляется ротовой жидкостью за счет ее буферных свойств, которая обеспечивается в большей степени бикарбонатной буферной системой. Жидкости со своим индивидуальным значением буферной емкости могут оказать как положительный, так и отрицательный эффект на буферные свойства слюны. В нашем эксперименте биодобавка Цинк без сахара обнаружила буферные емкости по кислоте и по основанию больше, чем у Цинкита, что можно объяснить тем, что в ходе химической реакции, происходящей при растворении таблетки Цинкита в воде образуется сильная кислота — серная.

Выводы. Установлено негативное влияние водных растворов биодобавок на полярный адсорбент мел, выступающий как модель зубной эмали. Оба раствора обладают слабокислым значением рН и демонстрируют уменьшение количества ионов водорода после адсорбции, что говорит об их закисляющей активности. Такое воздействие можно рассматривать как потенциально вызывающее эрозию и деминерализацию зубной эмали. Следовательно, растворы биодобавок цинкит и цинк без сахара следует рассматривать как агрессивные препараты, после приема которых нужны меры для нормализации состояния полости рта.

Несмотря на желтый цвет раствора цинка без сахара, что предполагает наличие красителя в составе, а, следовательно, и дополнительное закисляющее воздействие на ткани полости рта, именно эта биодобавка по всем параметрам, оценивающимся в исследовании, показала меньшие величины негативных воздействий по сравнению с биодобавкой Цинкит.

Список источников

1. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: официальный сайт — <http://cgon.rospotrebnadzor.ru/content/62/2683/> — ФБУЗ «Центр гигиенического образования населения Роспотребнадзора». Москва, 2022 (дата обращения 07.06.2022).

2. Moran V.H., Stammers A.L., Medina M.W., Patel S., Dykes F., Souverein O.W., Dullemeijer C., Pérez-Rodrigo C., Serra-Majem L., Nissensohn M., Lowe N.M. The relationship between zinc intake and serum/plasma zinc concentration in children: a systematic review and dose-response meta-analysis // *Nutrients*. 2012, Aug. № 4(8). P. 841–858. Epub 2012 Jul 26.

3. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. Метод. реком. МР 2.3.1.2432–08. 3.2.1. Рациональное питание. М., 2008. 40 с.

4. Громова О.А., Торшин И.Ю. Важность цинка для поддержания активности белков врожденного противовирусного иммунитета: анализ публикаций, посвященных COVID-19. Профилактическая медицина. 2020. № 23(3). P. 131–139.

5. National Library of Medicine: официальный сайт — <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zinc-citrate#section=Information-Sources>.

6. Hemingway C.A. et al. Erosion of enamel by non-carbonated soft drinks with and without toothbrushing abrasion // *The British Dental Journal*. 2006. Vol. 201. № 7. P. 447–450.

7. Муслев С.А., Арутюнов С.Д., Хуршудян С.А., Егорова О.С. Соки и безалкогольные напитки: влияние на состояние зубов потребителя // *Пиво и напитки*. 2020. № 1. С. 34–38.

УДК 544.08

***Радин М.А.¹, Широкова И.Ю.¹, Чухно А.С.^{1,2},
Штольман Е.А.¹, Гафаров М.Б.¹, Каленик Д.Д.¹***

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России,

²ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,

*Санкт-Петербург, Россия
radin.michail@pharmintotech.com*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В СУХИХ ОБРАЗЦАХ КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТОДОМ АТОМНО- ЭМИССИОННОГО СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА

Проведено определение содержания тяжелых металлов в телях конкретных образцов. Проведен анализ полученных значений и сверка полученных значения со значениями предельно допустимых концентраций.

Ключевые слова: тени, определение тяжелых металлов, тяжелые металлы, атомно-эмиссионный спектрометр, атомно-эмиссионная спектрометрия.

**Radin M.A.¹, Shirokova I.Y.¹, Chukhno A.S.^{1,2},
Shtolman E.A.¹, Gafarov M.B.¹, Kalenik D.D.¹**

¹St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg, Russia

DETERMINATION OF HEAVY METALS IN DRY SAMPLES OF COSMETIC PRODUCTS BY ATOMIC EMISSION SPECTRAL ANALYSIS

The content of heavy metals in the eyeshadows of specific samples was determined. The analysis of the obtained values and reconciliation of the obtained values with the values of maximum allowable concentrations was carried out.

Keywords: *eyeshadow, heavy metal detection, heavy metals, Atomic Emission Spectrometer, Atomic Emission Spectrometry.*

Косметика является неотъемлемой частью нашей жизни. Высокая востребованность у этого типа товаров и является причиной нашей заинтересованности данной темой. С ростом развития науки производители косметики начали добавлять половину периодической системы в свою продукцию. Уже давно существуют конкретные предельные допустимые концентрации тяжелых металлов в косметике, но вопрос в том, все ли косметические продукты соответствуют нормам безопасности для потребителя.

Атомный спектральный анализ (атомная спектрометрия) — группа методов аналитической химии, основанных на регистрации электромагнитного излучения, которое испускается или поглощается атомами пробы в результате изменения конфигурации (энергетического состояния) их внешних электронных оболочек. Аналитическим сигналом в данных методах является электромагнитная энергия в оптическом диапазоне длин волн (50–1000 нм) [1].

Возбуждение порошковых проб и регистрация спектральных линий производилась на установке, включающей в себя спектрограф ДФС-452 с фотодиодной системой регистрации. На рис. 1 изображена блок-схема спектральной установки. Угольный электрод с пробой и противоэлектрод устанавливаются в держателях штатива УШГ-4, размещенного в камере разряда (КР). Источник возбуждения спектра ИВС-

28 создает в межэлектродном промежутке дуговой или искровой разряд, что обеспечивает испарение и возбуждение спектра пробы. Излучение плазмы с помощью осветительной системы (ОС) — кварцевого линзового конденсора, направляется на входную щель (Щвх) спектрографа. Входящий в спектрограф гомоцентрический пучок света преобразуется в параллельный пучок и направляется сферическим зеркалом на дифракционную решетку. Дифракционная решетка (ДР) спектрографа, имеющая 1200 штрихов на 1 мм и работающая во втором порядке, разлагает свет от источника в спектр. Спектральный диапазон прибора — от 190 до 1100 нм, обратная линейная дисперсия — 0,8–0,63 нм/мм в первом порядке и 0,5–0,2 нм/мм во втором порядке. Разрешающая способность решетки: в первом порядке 60 000, во втором — 120 000. Фокусное расстояние зеркального объектива 1000 мм [2, 3].

Спектрограф ДФС-452

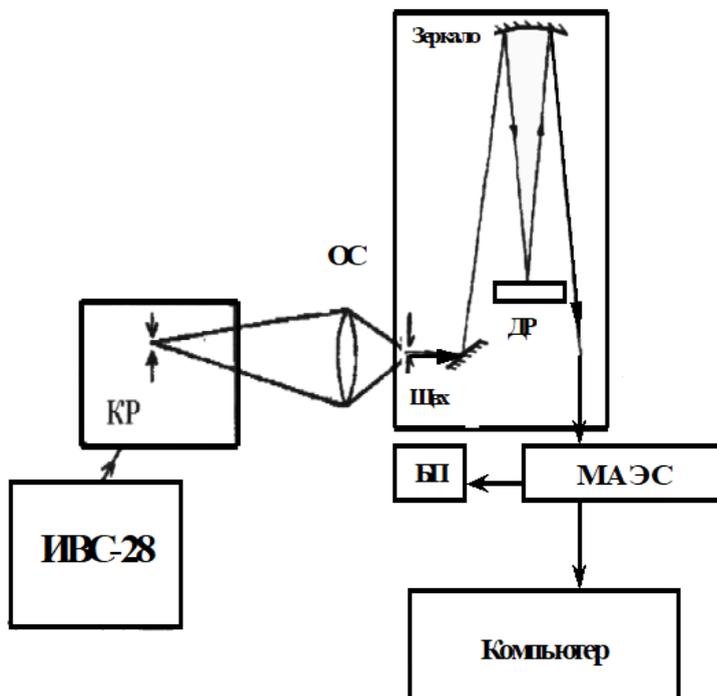


Рис. 1. Спектральный диапазон чувствительности фотоприемников находится в области от 200 до 1000 нм

Термостатирование фотоприемников осуществляется с помощью полупроводниковых микрохолодильников Пельтье и прецизионный тракт преобразования аналогового сигнала с фотоприемником в цифровой сигнал (динамический диапазон преобразователя 65000) совместно с быстродействующим последовательным каналом передачи данных в компьютер (10 Мбит/с) позволили свести до минимума ошибки регистрации спектра.

Программа АТОМ, работающая на базе операционной системы Windows, предоставляет аналитику широкий круг возможностей по визуализации и измерению спектральных линий, построению градуировочных графиков, расчету концентраций элементов в пробах, метрологическую оценку и статистическую обработку результатов измерений и выводу результатов анализов на печать.

МАЭС состоит из набора диодных линеек, аналогово-цифрового преобразователя, схемы сопряжения и схемы приема данных в компьютер и блока стабилизированного питания.

Один прибор МАЭС может содержать до 10 диодных линеек. В нашем случае установлено 5 диодных линеек, термостабилизированных с помощью полупроводниковых электрохолодильников Пелтье. Со всех установленных в приборе линеек во время работы производится регулярное считывание сигналов с заданным интервалом времени, называемым *временем экспозиции*. Эти сигналы проходят через усилитель, АЦП (Аналого-Цифровой Преобразователь) и через контроллер МАЭС передаются в компьютер, где в виде численных значений принимаются программой АТОМ и считаются единичным считыванием [4].

Программа АТОМ предназначена для работы с многоканальным анализатором атомно-эмиссионных спектров.

В нашей установке использовались линейки, состоящие из 2580 диодов, размером 1 мм × 12,5 мкм.

АЦП — важный элемент схемы МАЭС, влияющий на правильность формирования числового сигнала из сигнала диода, поскольку линейность преобразования АЦП непосредственно влияет на линейность отклика МАЭС. Разрядность АЦП в МАЭС последних моделей оставляет 16 бит, однако реальный динамический диапазон составляет от 10^3 до 10^4 в зависимости от условий регистрации и источника освещения [5–9].

Методика определения содержания тяжелых металлов в сухих образцах косметической продукции(тенях) включала в себя следующие процедуры.

В качестве объектов исследования были взяты сухие мелкодисперсные сухие образцы косметической продукции нескольких марок. Данные образцы прокаливались в сушильном шкафу до постоянной массы при 70 °С, после чего отбирались на аналитических весах навески массой 10 мг. Навески вносились в шкаф атомно-эмиссионного спектрофотометра.

Условия проведения эксперимента: в атомно-эмиссионном спектральном анализе использовался дуговой разряд при помощи ИВС (источник высокого напряжения) в следующих условиях: сила тока 18А, напряжение 380 В время дугового разряда 5–6 секунд температура плазмы 4000 °С. Использовался прибор ДФС452 с дифракционной решеткой 2400 штрихов на 1 мм, система регистрации спектров обеспечивалась светодиодной ПЗС-матрицей (МАЭС Новосибирск). Запись регистрируемых спектров сохранялась на компьютере с программным обеспечением атом 3,3, далее расшифровка спектров производилась по характеристическим длинами волн (из данных спектрометрических таблиц) в сравнении с относительными концентрациями эталонных(стандартных) образцов.

Стандартные растворы кадмия, меди, марганца, свинца и цинка готовили в колбах на 25 мл из головных растворов кадмия, меди имеющих концентрации: 375 мг/л; свинца и марганца: 37,5 мг/л, а цинка: 3750 мг/л [5–9].

Для получения следующих концентраций кадмия и меди стандартных образцов: 0,1 мг/г; 0,3 мг/г; 1 мг/г; 3 мг/г; были приготовлены их растворы с концентрациями соответственно 12,5 мкг/мл; 37,5 мкг/мл; 125 мкг/мл и 375 мкг/мл из их головных растворов. А для получения концентраций свинца и марганца стандартных образцов: 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 мг/г были приготовлены их растворы с концентрациями соответственно 1,25; 3,75; 12,5 и 37,5 мкг/мл из их головных растворов. И для цинка: 1; 3; 10; 30 мг/г были приготовлены их растворы с концентрациями соответственно 125; 375; 1250 и 3750 мкг/мл из его головного раствора.

Приготовленные растворы тщательно перемешали в течение 10–15 минут, а затем оставляли на 15–30 минут. На каждый 1 г свежеприготовленной основы стандартного образца ввели по 0,7 мл соответствующего раствора. Полученные стандартные образцы вновь осторожно перемешали (не допуская разбрызгивания и размазывания смеси по стенкам тигля) и высушили в сушильном шкафу при температуре 70 °С. Готовые порошки стандартов перенесли в чистые бумажные пакетики (так как не рекомендуется оставлять порошки в тиглях).

После проведения всех экспериментов на Атомно-эмиссионном данные вносятся в программу «Атом». Полное время экспозиции спектра (интегрирование сигнала) составляло 1 секунду. В программу «Атом» вводились длины волн аналитических линий искомым элементов, которые автоматически отыскивались в зарегистрированном спектре.).

Аналогичным образом в таблицу анализа автоматически заносились интенсивности аналитических линий из спектров стандартных образцов, возбуждение которых в дуговом разряде производилось в выше указанных условиях. По данным об интенсивностях аналитических линий и о концентрациях определяемых элементов в стандартных образцах программа «Атом» строила градуировочные графики в координатах: по оси абсцисс — логарифм концентрации (мкг/г), по оси ординат — логарифм интенсивности (отн.ед.). По этим графикам определяли концентрации кобальта, меди, марганца, олова и цинка [5–9].

Градуировочные зависимости, построенные по стандартным образцам, для определения тяжелых металлов представлены на рис. 2–4. В левом верхнем углу каждого графика приведены аналитические линии определяемых элементов с указанием длины волны в нм. Пунктирными линиями обозначены границы стандартного квадратичного отклонения градуировочного графика.

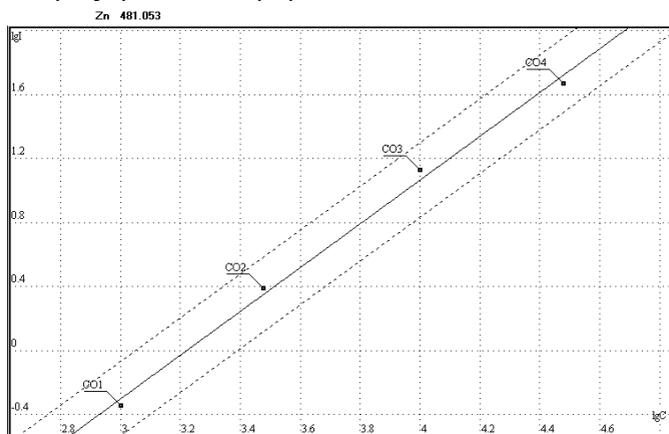


Рис. 2

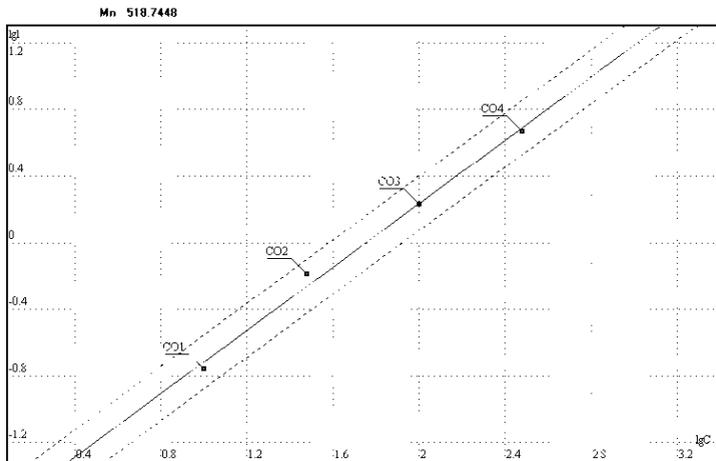


Рис. 3

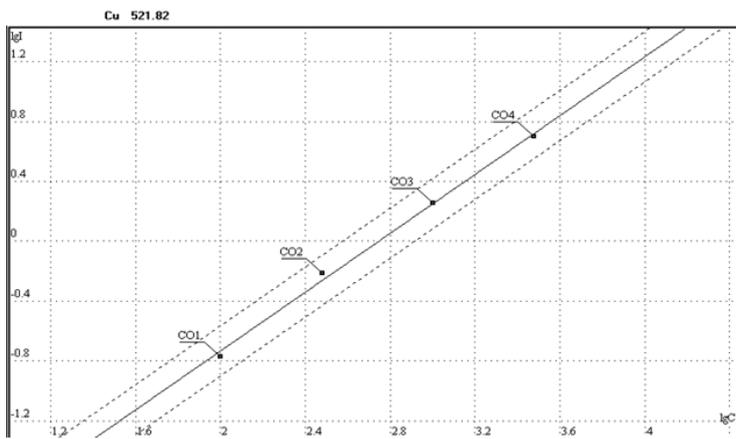


Рис. 4

Таблица 1

Металл	Значение	Значения ПДК
Zn	7,5	3
Mn	10	7
Cu	6	3
Co	2.5	1
Sn	6	5

В табл. 1 приведены результаты определения содержаний металлов в образцах теней. Как видно из этой таблицы, наибольшая концентрация марганца, проникая в организм через кожу, он, как и многие тяжелые металлы, имеет свойство накапливаться в организме, что в долгосрочной перспективе может привести к проблемам со здоровьем, но также мы можем наблюдать, что показатели меди превышают предельно допустимую концентрацию в два раза, хотя она является одним из самых токсичных тяжелых металлов из перечисленных, для данной таблицы мы взяли только тяжелые металлы, чьи значения превышали ПДК, поэтому стоит добавить что там присутствовали и другие элементы в меньших концентрациях. Данные по ПДК для тяжелых металлов приведены из ГОСТа [10].

Статистическая обработка результатов анализов показала, что относительное стандартное отклонение приведенных в таблицах данных во всех случаях не превышает 0,25.

Выводы.

1. Разработана методика определения меди, марганца, кобальта, олова и цинка в сухих образцах косметической продукции методом атомно-эмиссионного спектрального анализа с дуговым источником возбуждения спектра.

2. Исследована возможность применения спектрографа ДФС-452, модернизированного системой фотодиодной регистрации спектров.

3. Освоены и изучены аналитические возможности регистрирующей системы МАЭС и ее программного обеспечения «Атом».

4. Разработана методика приготовления стандартных образцов для анализа теней для век, по которой изготовлены четыре образца сравнения с различным содержанием меди, марганца, кобальта, олова и цинка.

5. Определены содержания пяти тяжелых металлов с относительным стандартным отклонением не более 0,25 в тенях для век. Проведено сравнение полученных результатов с литературными данными.

6. Обнаружены превышения показателей ПДК что говорит о нарушениях со стороны производителя.

Список литературы

1. Аналитическая химия. Методы идентификации и определения веществ / под. ред. Л.Н. Москвина. СПб.: Лань, 2019. 584 с.
2. Сибирцев В.С., Чеканов М.А., Нечипоренко У.Ю., Маслова А.Ю., Гульков Е.Г., Радин М.А. Сравнительное оптико-электрохимическое исследование про- и антибиотических свойств водных растительных экстрактов. Вестник Международной академии холода. 2020. № 1. С. 75–83.
3. Васильева П.А., Нестерова Д.И., Чеботова П.А., Дмитриева И.Б. Изучение влияния физико-химических характеристик экстрагента на процесс извлечения флавоноидов из плодов софоры японской. Бутлеровские сообщения. 2022. Т. 71. № 8. С. 118–125.
4. Дробышев А.И., Емелина О.И. Спектроаналитические возможности униполярной дуги при фотоэлектрической регистрации спектра. Журнал аналитической химии. 1995. Т. 51. № 10. С. 1047–1050.
5. Сибирцев В.С., Игнатьева А.Ф., Шичкова К.А., Чан Т.Т., Стров С.А., Радин М.А. Исследование влияния высокочастотных электрических полей на жизнедеятельность микроорганизмов при различной температуре. Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2017. Т. 17. № 2. С. 279–286.
6. Дмитриева И.Б., Эрдни-Гаряев С.Э., Чухно А.С., Павлова Е.Ю., Коряковская М.О., Пюрбеева А.А. Адсорбция диклофенака натрия на активированном угле, оксиде и гидроксиде железа (III). Бутлеровские сообщения. 2018. Т. 53. № 3. С. 136–141.
7. Иванова И.С., Попов А.С., Чистякова А.В., Чухно А.С. Количественный анализ содержания нитритов в рыбопродуктах методом фотометрии. Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. 2020. № 6 (65). С. 74–78.
8. Родионова Е.Ю., Дмитриева И.Б., Чухно А.С. Электрокинетические свойства хлорофилла в водных растворах 1-, 2- и 3-зарядных катионов. Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 34. № 6. С. 130–134.
9. Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Силаева Д.С., Сенина А.С., Кошевенко А.С., Назипова А.Р. Сорбция ионов H^+ и OH^- на хлорофилле, влияние рН на устойчивость водных дисперсий хлорофилла. Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 34. № 5. С. 124–130.
10. Национальный стандарт Российской Федерации, ГОСТ Р 52343-2005.

УДК 547.9, 57.044, 57.083.1, 543.95

Сибирцев В.С., Радин М.А., Мамина А.А.
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

МЕТОДИКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ К СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

В последнее время в фармацевтической и иных отраслях народного хозяйства все более актуальной становится проблема разработки достаточно объективных и в то же время экспрессных и доступных для широкого применения способов оценки влияния различных химических соединений как синтетического, так и природного происхождения на динамику жизнедеятельности микроорганизмов, которые могут входить в состав естественной микробиоты человека, вызывать различные инфекционные заболевания, токсикозы, аллергические реакции, способствовать порче продукции, участвовать в различных биотехнологических процессах и т.д. В связи с этим целью настоящей работы стала разработка и апробация экспрессной и объективной инструментальной методики оценки про- и антибиотических свойств фармацевтической и иной продукции, включая различные растительные экстракты, эфирные масла и т.п. Результатом этого явилась описанная ниже методика микробиологического тестирования, предусматривающая периодическую (через каждые 2 часа) регистрацию изменений рН, редокс потенциала и электропроводности жидкой питательной среды, инкубируемой в присутствии и в отсутствие жизнеспособных тестовых микроорганизмов и тестируемых образцов.

*Апробация данной методики (результаты которой также представлены ниже) была осуществлена в ходе сравнительного анализа антибиотической активности в отношении *Lactobacillus acidophilus* (являющегося типичным представителем микробиоты человека) разных концентраций эфирных масел, полученных из 7 видов различного растительного сырья, используемого в фармацевтической промышленности.*

Ключевые слова: биотестирование микробиологическое, антибиотические свойства, эфирные масла.

Sibirtsev V.S., Radin M.A., Mamina A.A.
*St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
St. Petersburg, Russia*

THE METHOD OF ELECTROCHEMICAL MICROBIOLOGICAL TESTING IN APPLICATION TO THE COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE ANTIBIOTIC PROPERTIES OF ESSENTIAL OILS

Recently, in the pharmaceutical and other sectors of the national economy, the problem of developing sufficiently objective and at the same time express and accessible for wide application methods for assessing the influence of various chemical compounds of both synthetic and natural origin on the dynamics of the vital activity of microorganisms, which may include into the composition of the natural human microbiota, cause various infectious diseases, toxicosis, allergic reactions, contribute to product spoilage, participate in various biotechnological processes, etc. In this regard, the purpose of this work was to develop and test an express and objective instrumental method for assessing the pro- and antibiotic properties of pharmaceutical and other products, including various plant extracts, essential oils, etc. This resulted in the microbiological testing procedure described below, which provides for periodic (every 2 h) recording of changes in pH, redox potential, and electrical conductivity of a liquid nutrient medium incubated in the presence and absence of viable test microorganisms and test samples.

*Approbation of this technique (the results of which are also presented below) was carried out in the course of a comparative analysis of antibiotic activity against *Lactobacillus acidophilus* (which is a typical representative of the human microbiota) of different concentrations of essential oils obtained from 7 types of different plant materials used in the pharmaceutical industry.*

Keywords: *biotesting microbiological, antibiotic properties, essential oils.*

Введение. В последнее время в фармацевтической и других отраслях народного хозяйства все более актуальной становится проблема разработки достаточно объективных и в то же время экспрессных и доступных для широкого применения способов оценки влияния различных химических соединений как синтетического, так и природного происхождения на динамику жизнедеятельности разных микроорганизмов, которые могут входить в состав естественной микрофлоры человека, вызывать различные инфекционные заболевания, токсикозы,

аллергические реакции, способствовать порче продукции, участвовать в различных биотехнологических процессах и т.д.

Однако принятые в настоящее время в качестве стандартных при микробиологическом тестировании процедуры визуальной оценки общей выживаемости тестовых микроорганизмов либо величины зоны задержки роста их колоний требуют для своего проведения значительных затрат времени, материалов и труда квалифицированного персонала, давая, в результате, лишь весьма неполную, субъективную и «статичную» информацию о летальных нарушениях жизнедеятельности тестовых организмов [1–3].

В свою очередь, из объектов тестирования все больший интерес вызывают «эфирные масла» (ЭфМ), получаемые из растительного сырья разными физико-химическими способами [4]. В частности, ЭфМ в настоящее время широко применяются в фармацевтической и других отраслях промышленности в качестве про- либо антимикробных, нормализующих (используемых, в том числе, при лечении различных нервных, сердечно-сосудистых, диабетических, пищеварительных и иных заболеваний), консервирующих, антиоксидантных, ароматизирующих, вкусовых и иных видов добавок [1–8].

В связи с этим, **целью** данной **работы** стала разработка экспрессной и объективной инструментальной методики оценки про- и антибиотических свойств фармацевтической и иной продукции, а также последующая апробация этой методики на примере сравнительного анализа влияния на динамику жизнедеятельности микробиоты человека коммерческих образцов различных ЭфМ.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования в настоящей работе были взяты коммерческие образцы ЭфМ, полученные из следующих видов растительного сырья: семена аниса обыкновенного (*Pimpinella anisum*) (№ 1) и бадьяна настоящего (анис звездчатый, *Illicium verum*) (№ 2), а также кожура плодов апельсина (*Citrus sinensis*) (№ 3), мандарина (*Citrus reticulata*) (№ 4), грейпфрута (*Citrus paradisi*) (№ 5), лимона (*Citrus limon*) (№ 6) и лайма (*Citrus aurantiifolia*) (№ 7).

При этом указанные образцы были закуплены у таких крупных российских их производителей, как Mirrolla (<https://mirrolla.ru>), Botanika (<https://botavikos.ru>) и Oleos (<https://oleos-info.ru>). А для анализа влияния разных концентраций ЭфМ на динамику жизнедеятельности микроорганизмов, исходя из результатов уже имевшихся авторских наработок по различным способам инструментального биотестирования [9–11], была разработана следующая методика.

Для выборки из тестируемых образцов (ТО) проводилось по 4-е серии измерений. Перед началом каждой серии готовилась питательная

среда (ПС), представлявшая собой предварительно стерилизованное молоко 1,5% жирности с рН 7,2 — 0,2 (при этом жирность и рН ПС доводились до нужных значений дистиллированной водой и водным раствором с 2 М NaOH). Затем эта GC засеивалась *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (которые были выбраны в качестве типичных представителей микробиоты, широко распространенной как во вне, так и внутри организма человека и других теплокровных животных, активно участвуя при этом в деструкции различных биополимеров). После этого упомянутая ПС с тестовыми микроорганизмами (ТМ) инкубировалась при $37 \pm 0,1$ °С, пока содержание в ней жизнеспособных микроорганизмов не достигало 5×10^6 кл/мл (что удостоверялось нефелометрическим способом по бактериальному стандарту мутности).

Далее, полученная тестовая среда (ТС) разливалась по «тестовым» измерительным емкостям (ИЕ), в каждую из которых предварительно добавлялось (по 3 ИЕ в параллель) количество ТО, необходимое для достижения заданной его концентрации в ТС (в то время как 3 «контрольных» ИЕ, содержали ТС с жизнеспособными ТМ без ЭфМ).

Затем все ИЕ инкубировались при $37 \pm 0,1$ °С в течение еще 6 часов.

При этом у ТС, содержащихся в каждой из ИЕ, последовательно, с интервалом 2 часа регистрировались рН, редокс потенциал (E , мВ) и удельная линейная низкочастотная электропроводность (X , мСм/см). Причем рН и E регистрировались с помощью иономера «Эксперт-001» (РФ) с комбинированными электродами «ЭСК-10601/7» и «ЭРП-105»; а X регистрировалась с помощью кондуктометра «Эксперт-002» (РФ) с погружным датчиком «УЭП-П-С», работающим на частоте 1,6 кГц.

После чего общие степени активирования (+) либо ингибирования (–) жизнедеятельности ТМ заданными концентрациями ТО после k часов их совместного инкубирования в жидкой ТС ($\varepsilon_{V,k}$, %) рассчитывались по формуле:

$$\varepsilon_{V,k} = (\varepsilon_{pH,k} + 0,7\varepsilon_{E,k} + 0,7\varepsilon_{X,k}) / 2,4, \quad (1)$$

где величины $\varepsilon_{pH,k}$, $\varepsilon_{E,k}$ и $\varepsilon_{X,k}$ определялись отдельно по результатам измерений рН, E и X у ТС в ИЕ в ходе инкубации этих ИЕ по формуле:

$$\varepsilon_{i,k} = 100 \times (\Delta Y_{t_i,k} - \Delta Y_{c_i,k}) / \Delta Y_{c_i,k}; \quad (2)$$

индекс « i » показывал измерения по какому параметру (рН, E или X) учитывались в формуле (2); а величины $\Delta Y_{t_i,k}$ и $\Delta Y_{c_i,k}$ определялись как усредненные по выборке из $N=3 \times 4=12$ ИЕ с одинаковыми концентрациями одного и того же ТО изменения значений i -параметра ТС (рН, E или X), произошедшие за k часов от начала инкубирования этой

среды в присутствии заданной концентрации ТО (ΔYt) либо в отсутствие ТО (ΔYc).

Результаты и их обсуждение. Наиболее интересные данные, полученные описанным выше способом, представлены в табл. 1, исходя из которой можно сделать следующие выводы.

Среди исследованных коммерческих образцов ЭфМ наиболее активные пролонгированные (долгострочные) антибиотические свойства в отношении *L.acidophilus* (характеризуемые в табл. 1 величиной $\varepsilon_{v,6}$, определяемой через 6 ч инкубации ТМ в присутствии ЭфМ) проявили образцы, полученные из семян бадьяна настоящего и кожура плодов лимона, для которых при их концентрации в ТС, равной 1 об.%, значения величины $\varepsilon_{v,6}$ составили — 67 ± 8 , $-55\pm 7\%$ соответственно (см. табл. 1 для образцов № 2 и 6).

Начальная (краткосрочная) антибиотическая активность ЭфМ (характеризуемая в табл. 1 величиной $\varepsilon_{v,2}$, определяемой через 2 часа инкубации ТМ в присутствии ЭфМ) в большинстве случаев была достоверно больше их пролонгированной активности. В то время как «среднесрочная» (по времени взаимодействия ЭфМ с ТМ) антибиотическая активность ЭфМ (характеризуемая в табл. 1 величиной $\varepsilon_{v,4}$, определяемой через 4 ч инкубации ТМ в присутствии ЭфМ) в большинстве случаев была промежуточной по величине между $\varepsilon_{v,2}$ и $\varepsilon_{v,6}$ тех же ЭфМ.

Кроме того, для верификации представляемой в этой работе методики микробиологического тестирования антибиотическая активность тех же концентраций тех же образцов ЭфМ, что рассматривались здесь выше, была оценена авторами также с помощью «стандартной» методики микробиологического тестирования [1–3].

Последняя предусматривала визуальный подсчет колоний *L.acidophilus*, выросших после 24 ч инкубации их при $37\pm 0,1$ °С на плотной ПС в присутствии и в отсутствие заданных количеств ТО ЭфМ с последующим расчетом величины ε_s по формуле (2). При этом высевание проводилось для нескольких последовательных разведений ТС — каждое в нескольких параллельных чашек Петри. После чего отбирались те разведения, при использовании которых на одной чашке Петри выросло не менее 10 и не более 50 колоний ТМ. И данные по этим разведениям соответствующим образом статистически обрабатывались.

Таблица 1. Степени ингибирования жизнедеятельности *Lactobacillus acidophilus* (ε , %), определявшиеся в присутствии разных количеств коммерческих образцов различных «эфирных масел» (ЭфМ)

	1	2	3	4	5	6	7
C_{TS}	1 об.%						
$\varepsilon_{V,2}$	-52	-84	-47	-65	-60	-58	-57
$\varepsilon_{V,4}$	-49	-76	-41	-56	-41	-57	-52
$\varepsilon_{V,6}$	-47	-67	-37	-39	-40	-55	-49
C_{TS}	0,5 об.%						
$\varepsilon_{V,2}$	-30	-55	-34	-41	-28	-39	-43
$\varepsilon_{V,4}$	-29	-50	-30	-30	-19	-35	-39
$\varepsilon_{V,6}$	-25	-43	-27	-21	-18	-33	-33
C_{TS}	0,3 об.%						
$\varepsilon_{V,2}$	-21	-28	-23	-25	-20	-27	-34
$\varepsilon_{V,4}$	-19	-23	-21	-21	-16	-22	-30
$\varepsilon_{V,6}$	-17	-19	-19	-16	-13	-19	-25
C_{TS}	0,1 об.%						
$\varepsilon_{V,2}$	-16	-16	-12	-14	-13	-16	-24
$\varepsilon_{V,4}$	-14	-14	-11	-12	-11	-13	-20
$\varepsilon_{V,6}$	-9	-12	-9	-9	-8	-9	-16

Примечания. Соответствие номеров коммерческих образцов ЭфМ видам сырья, использованного для их приготовления, а также метод расчета $\varepsilon_{V,2}$, $\varepsilon_{V,4}$ и $\varepsilon_{V,6}$ (%), определявшихся по формуле (1) через 2, 4 и 6 часов инкубирования *L. acidophilus* в жидкой тестовой среде в присутствии и в отсутствие ЭфМ) см. в разделе «Материалы и методы». C_{TS} (об. %) — концентрация тестируемых ЭфМ в тестовой среде. Относительные ошибки определения величин ε_V для всех указанных в таблице их значений находились в диапазоне от 10 до 20%.

В результате для всех концентраций всех ТО имела место 90% (в случае $k=2$ или 4 ч) либо 95% (в случае $k=6$ ч) достоверная корреляция между величинами ε_S и $\varepsilon_{V,k}$, определявшимися, соответственно, с помощью «стандартной» визуальной и представляемой здесь инструментальной методик микробиологического тестирования.

Заключение. С помощью, представленной в настоящей работе методики микробиологического тестирования можно существенно более экспрессно (в течение нескольких часов, а не суток), объективно (за счет уменьшения роли субъективного человеческого фактора при замене в процессе измерений визуальных методов на инструментальные) и информативно, чем при использовании «стандартных» микробиологических методов, оценивать влияние на динамику жизненной активно-

сти тестовых микроорганизмов различных образцов фармацевтической и иной продукции (включая разные растительные экстракты). При этом большая информативность предлагаемой методики достигается за счет того, что, во-первых, инструментальные способы измерения чувствительней визуальных (применяемых в «стандартных» микробиологических методах); во-вторых, представленная здесь методика дает возможность оценивать динамику изменения жизненной активности тестовых микроорганизмов на множестве произвольно выбираемых временных отрезков (в отличие от стандартных процедур, где измерения производятся лишь один раз, в конце всего периода инкубации тестируемых образцов); и в-третьих, предлагаемая нами методика предполагает оценку изменения жизненной активности микроорганизмов сразу по нескольким независимым показателям (таким как рН, редокс потенциал и электропроводность тестовой среды), а не только по одному (мутности тестовой среды, числу колоний микроорганизмов или величине зоны задержки их роста), как в случае применения стандартных микробиологических методик. Кроме того, представленная здесь методика существенно менее материалоемка и трудоемка по сравнению с аналогичными стандартными микробиологическими методами, характеризуется большей чувствительностью и точностью получаемых результатов, а также дает гораздо больше возможностей для автоматизации процесса анализа.

Все это делает представленную методику существенно более доступной для массового применения, чем ранее используемые стандартные методы микробиологического тестирования образцов различной продукции. Последнее же является весьма актуальным в свете того, что одним из важных условий обеспечения должного уровня безопасности и качества жизни людей является не только своевременное и качественное тестирование новой фармацевтической, косметической, пищевой и иной продукции; но и постоянный широкий мониторинг про- и антибиотических свойств аналогичной продукции, уже допущенной к массовому употреблению, с целью выявления недоброкачественных либо успевших до окончательной реализации испортиться или претерпеть химическое или биологическое заражение ее образцов.

Список литературы

1. Sutherland J., Miles M., Hedderley D., Li ., Devoy S., Sutton K., Lauren D. *In vitro* effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009. Vol. 60. № 8. P. 717–727. <https://doi.org/10.3109/09637480802165650>.
2. Das S., Anjeza C., Mandal S. Synergistic or additive antimicrobial activities of Indian spice and herbal extracts against pathogenic, probiotic

and food–spoiler micro-organisms. *International Food Research Journal*. 2012. Vol. 19. № 3. P. 1185–1191.

3. Al-Zubairi A., Al-Mamary M.A., Al-Ghasani E. The antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of essential oil from different aromatic plants. *Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2017. Vol. 6. № 9. P. 224–233. <http://garj.org/garjmms>.

4. Rodino S., Butu M. *Functional and Medicinal Beverages*. Vol. 11. *The Science of Beverages*. Academic Press. 2019. P. 73–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00003-0>.

5. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils — a review. *Food and chemical toxicology*. 2008. Vol. 46. № 2. P. 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.

6. Sutherland J., Miles M., Hedderley D., Li J., Devoy S., Sutton K., Lauren D. In vitro effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009. Vol. 60. № 8. P. 717–727. <https://doi.org/10.3109/09637480802165650>.

7. Donsi F., Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*. 2016. Vol. 233. P. 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>.

8. Ju J., Xie Y., Guo Y., Cheng Y., Qian H., Yao W. Application of edible coating with essential oil in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019. Vol. 59. № 15. P. 2467–2480. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1456402>.

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

10. Sibirtsev V.S., Uspenskaya M.V., Garabagiu A.V., Shvets V.I. An integrated method of instrumental microbiotesting of environmental safety of various products, wastes, and territories. *Doklady Biological Sciences*. 2019. Vol. 485. № 1. P. 59–61. <https://doi.org/10.1134/S001249661902011X>.

11. Sibirtsev V.S., Garabagiu A.V., Shvets V.I. New technique for integrated photofluorescence microbiotesting. *Doklady Biological Sciences*, 2019, Vol. 489. № 6. P. 196–199. <https://doi.org/10.1134/S0012496619060103>.

УДК 66.971:541.1:621.039

**Слободов А.А.^{1,2}, Радин М.А.³, Ворожцова Ю.С.², Ефимов Р.Д.²,
Мелентьев А.В.², Иванова А.Н.²*

*¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
технологический институт»*

²Университет ИТМО,

*³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-
фармацевтический университет»*

Минздрава России,

Санкт-Петербург, Россия

** e-mail: aslobd@gmail.com*

ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ РАСЧЕТА ХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ В УСЛОВИЯХ СИНТЕЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Построена термодинамическая модель физико-химических взаимодействий, применимая для условий синтеза органических функциональных материалов в широкой области значений параметров состояния (состава, температуры, давления).

Выполнен цикл оптимизационных расчетов фазово-химических превращений для условий синтеза акриловых гидрогелей в широкой области составов и температур (превосходящей возможные разбросы, допустимые технологическими регламентами).

Полученные результаты моделирования и расчетов позволяют выявить основные продукты взаимодействия и закономерности влияния параметров состояния (состава и температуры) на характер протекающих физико-химических превращений в ходе синтеза.

Ключевые слова: *термодинамика, моделирование, расчет, фазовый и химический состав, превращения, гидрогели.*

**Slobodov A.A.^{1,2}, Radin M.A.³, Vorozhtsova Y.S.², Efimov R.D.²,
Melentiev A.V.², Ivanova A.N.²**

¹*St. Petersburg State Technological Institute,*

²*St. Petersburg National Research University of Information
Technologies, Mechanics and Optics,*

³*St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University,
St. Petersburg, Russia*

POSSIBILITIES OF THERMODYNAMIC PHYSICO-CHEMICAL MODELING FOR THE CALCULATION OF CHEMICAL TRANSFORMATIONS UNDER THE CONDITIONS OF DRUG SYNTHESIS

A thermodynamic model of physicochemical interactions is constructed, which is applicable to the conditions for the synthesis of organic functional materials for medical purposes in a wide range of state parameters (composition, temperature, pressure). A cycle of optimization calculations of phase-chemical transformations for the conditions of acrylic hydrogels synthesis in a wide range of compositions and temperatures (exceeding possible scatter allowed by technological regulations) has been performed. The obtained results of modeling and calculations make it possible to reveal the main products of interaction and the regularities of the influence of the state parameters (composition and temperature) on the nature of the occurring physicochemical transformations during the synthesis.

Keywords: *thermodynamics, modeling, calculation, phase and chemical composition, transformations, medicine, hydrogels.*

Общее описание проблемы и подходы к ее решению. Физико-химические процессы, происходящие при синтезе очень многих органических материалов, в том числе медицинского назначения, определение реального (после всех взаимодействий в исходной смеси) вещественного состава получаемого продукта — малоизученная область исследований и тяжело поддается экспериментальному изучению, особенно в случаях химической сложности (высокой компонентности) материала. Основная причина этого — соответствующая сложность и взаимосвязанность ряда параллельно протекающих при синтезе химических реакций, фазовых превращений, многообразии составов материала, широта температурного диапазона и др. [1–3].

В частности, в современном мире неуклонно растет востребованность в сложных лекарственных препаратах, обладающих важными специфическими свойствами, такие, например, как ранозаживляющие,

сорбционные, водопоглощающие и др., применимые в самых широких областях (биомедицине, сельском хозяйстве и др.). Однако рост числа производств и количества выпускаемых подобных материалов, широко применяемых в различных областях медицины, фармакологии и др. существенно сдерживается в силу возникновения значительных трудностей при разработке технологии производства именно в силу сложности и малоизученности протекающих при синтезе физико-химических процессов [3–6].

Весьма перспективными материалами этого класса являются, например, полимерные акриловые гидрогели (супервлагоабсорбенты (СВА)) — достаточно высококомпонентные (6-8 и выше) системы. Кроме того, их синтез является сложным и многофакторным процессом, поэтому проведение комплекса экспериментов, опирающихся на современные возможности доступных технологий в этой области, оказываются зачастую не только трудно поддающимися физико-химическому исследованию, но и экономически неоправданными и нецелесообразными [6–9].

Весьма перспективным методом решения подобных задач определения реального (в результате синтеза) фазово-химического состава, влияние на него параметров состояния (состава, температуры, давления) является термодинамическое физико-химическое моделирование и расчет подобных систем и процессов. И хотя эта методология уже доказала свою достаточную эффективность и корректность, однако полноценная реализация такого подхода, обеспечивающая необходимую достоверность получаемых результатов, требует всякий раз выполнения целого комплекса различных условий [3, 10, 11].

И хотя в целом эти методы моделирования и расчета (как превращений и равновесий веществ, так и их термодинамических характеристик) к настоящему времени получили достаточное развитие (в том числе разработаны компьютерные программы, комплексы, термодинамические базы данных и др.), нередко по-прежнему ощущается острая нехватка необходимых для ее реализации как строгого обоснования и развития методологии физико-химического моделирования подобных систем и процессов, так и термодинамических данных по свойствам достаточно большого числа соединений — органических, в первую очередь. Отметим, что эта достаточно общая задача имеет важную как фундаментальную научную (физико-химические свойства веществ), так и практическую (технология синтеза материалов и др.) составляющие.

Имеющиеся методы и компьютерные программы моделирования и расчета, а также системы и базы термодинамических данных, даже

наиболее авторитетные (США, Япония, Германия, Россия и др.), недостаточно эффективны, полны и не всегда достоверны по содержащейся в них информации [1222]. А термодинамическое моделирование синтеза и поведения полимерных органических материалов, физико-химических процессов при синтезе и т.п. — практически неразработанная сегодня проблема.

Имеется также ряд хорошо известных разработок (методов, компьютерных программ), ориентированных на расчет достаточно сложных химико-технологических процессов — например, Aspen Plus, Hysis и др. Но, к сожалению, они предусматривают полное знание объекта исследования (состава потока, смеси) и их характеристик (на основе предлагаемых данных и моделей (идеальных, моделей Вильсона, Unifac, реактора Гиббса и др.)). А на решение стоящего вопроса — во что же превратятся исходные реагенты (компоненты смеси), как на это может повлиять их соотношение, температура и др. — эти подходы и не рассчитаны, поэтому такие значимые как с научной, так и практической точек зрения вопросы выявления и описания физико-химических процессов и соответствующих закономерностей при создании полимерных органических материалов, акриловых СВА, в частности, на сегодня являются, к сожалению, практически неразработанными.

Именно поэтому учет особенностей рассматриваемых водопоглощающих материалов, условий их синтеза при использовании и разработке методологии термодинамического моделирования и расчета физико-химических процессов, что дает основу для выявления и анализа этих процессов, является основной целью данной работы.

Методология моделирования и расчета. В силу того, что ставилась задача физико-химического моделирования достаточно широкого круга (класса) многокомпонентных систем и процессов различной природы, не имеющих существенных ограничений на основные параметры состояния исследуемых систем (многообразие состава, компонентность, широту рассматриваемого диапазона температур, давлений и др.), представленная ниже методология носит достаточно общий характер (применимый для гораздо более широкого круга систем и процессов, чем исследуемые гидрогели).

Итак, рассмотрим физико-химическую систему, состав которой определяется m независимыми компонентами. Допустим, что после всех допустимых фазовых и химических превращений в изучаемой системе образовалось (с учетом фазовых состояний) n химических соединений. Тогда, независимо от природы этих превращений, должен соблюдаться материальный баланс, т.е. для любого компонента в ходе превращений

в системе его абсолютное содержание $\{y_j^0\}_{j=1}^m$ должно оставаться неизменным, сумма по всем его \mathbf{n} компонентам системы (система закрытая).

Пусть, далее, \mathbf{n} — это общее число веществ, потенциально способных образоваться в системе в ходе технологического процесса синтеза (очевидно, $\mathbf{n} \geq \mathbf{m}$).

Первоначально рассмотрим случай фиксированных значения параметров состояния нашей системы. Тогда, как известно [10, 11, 23], состоянию равновесия отвечает точка экстремума соответствующей термодинамической функции (свободной энергии) системы. Известно, что, например, при постоянстве температуры \mathbf{T} и давления \mathbf{P} в системе общие равновесные условия должны отвечать минимуму ее энергии Гиббса \mathbf{G} . В соответствии с описанным выше данную задачу определения физико-химических превращений можно тогда рассматривать [10, 23] как задачу условной минимизации соответствующей характеристической функции (здесь, при постоянстве \mathbf{T} и \mathbf{P} , это энергия Гиббса \mathbf{G} системы; при других условиях — соответствующие, «свои» характеристические термодинамические функции):

$$\left\{ \begin{array}{l} G = \sum_{i=1}^n \mu_i y_i \equiv \sum (\mu_i^0 + RT \ln \gamma_i x_i) y_i \rightarrow \min_{\{y_i\}} \\ \sum_{i=1}^n a_{ij} y_i = y_j^0, j \in 1:m \\ y_i \geq 0, i \in 1:n \end{array} \right.$$

где $y_j^0 (j \in 1:m)$ — определенные мольные количества основных элементов;

$\{a_{ij}\}_{n \times m}$ — стехиометрическая матрица системы, выражающая все компоненты системы через базис;

$y_i, \mu_i, \mu_i^0 (i \in 1:n)$ — искомые количества (моль) компонентов системы, их химические и стандартные химические потенциалы соответственно;

$x_i, \gamma_i (i \in 1 : n)$ — концентрации и соответствующие коэффициенты активности компонентов системы.

Практически все известные к сегодняшнему дню методы решения подобных задач имеют ряд существенных ограничений — либо слишком узконаправленны, т.е. могут применяться только для условий либо фазового, либо химического равновесия, либо для расчета только идеальных систем и др. [10, 21, 24]. Кроме того, нередко эти методы предназначены для расчета конкретного класса химических реакций, либо они ограничены по составу, числу фаз и компонентов, либо в них недостаточно используется современный математический аппарат теории и методов оптимизации (что нередко приводит к некорректным результатам), либо описание модели превращений и равновесий, к которым они применяются, оказываются нередко термодинамически некорректными [3, 10, 25].

Поэтому, проанализировав существующие методы расчетов фазовых и химических равновесий [3, 10, 21–24], можно сделать вывод, что хотя на сегодняшний день существует весьма значительное многообразие методов, в целом практически ни один из них не является достаточно эффективным и не решает полноценно поставленную задачу.

В силу сказанного, за основу был взят комплекс методов, соответствующих компьютерных программ и баз термодинамических данных, в целом решающий основные из отмеченных проблем (со всем необходимым алгоритмическим, программным и информационным обеспечением) [3, 11, 23–25]. Существенная его особенность — значительная универсальность и отсутствие основных ограничений на сложность исследуемых систем (их природу, число компонентов, фаз, на значения параметров состояния и др.). Кроме того, для сформулированной и формализованной задачи (1) оптимизации (нелинейной условной минимизации) разработан специальный итерационный метод решения 2-го порядка, обладающий свойствами глобальной сходимости (за счет отдельной процедуры демпфирования). Однако он требовал доработки для корректного использования в рассматриваемых системах по двум аспектам — достаточно корректного учета природы взаимодействий между реагентами синтезируемых гидрогелей, и, второе — уточнение и получение термодинамических характеристик исходных веществ и возможных продуктов взаимодействия в необходимом температурном диапазоне.

Как результат применения общей физико-химической модели превращений и равновесий к расчету процесса синтеза акриловых гидрогелей получен в итоге ответ на основные из поставленных вопросов о

химизме протекающих процессов — в зависимости как от температуры, так и содержания каждого из исходных компонентов. Отметим в связи с этим, что в работе изучены протекающие физико-химические процессы не только для исходного состава, но и для условий независимого варьирования содержания каждого из веществ-компонентов, используемых при синтезе (7-компонентная система).

Полученные данные дают богатую и детальную картину физико-химических взаимодействий в изученных системах, выявлены основные процессы и продукты взаимодействия в зависимости от всех указанных варьируемых параметров. Их детальный анализ не входит в цель данной работы, а представляет самостоятельное и достаточно объемное исследование. Однако даже некоторые из полученных результатов — по влиянию температуры (для указанного, «типичного» состава) и содержания щелочного нейтрализатора на химию процессов при синтезе — иллюстрированные рисунками 1 и 2, свидетельствуют о сложности и взаимосвязанности процессов, протекающих при синтезе функциональных гидрогелей.

Так, представленные температурные зависимости (рис. 1) четко и строго определяют состав продуктов взаимодействия как при низких температурах, так и их изменение с ростом температуры. Отсюда нетрудно видеть, во что превращаются исходные компоненты при синтезе гидрогеля и каков вещественно-химический состав последнего при всех изученных температурах.

Кривые, представленные на рис. 2, дают представление о химизме взаимодействия нейтрализатора NaOH в реакционной смеси. Нетрудно видеть, что уже небольшие количества щелочи заметно влияют практически на все продукты взаимодействия — как органические, так и неорганические.

Получаемые указанными методами результаты фактически определяют физико-химическую основу для разработки эффективных технологий синтеза рассматриваемых функциональных материалов.

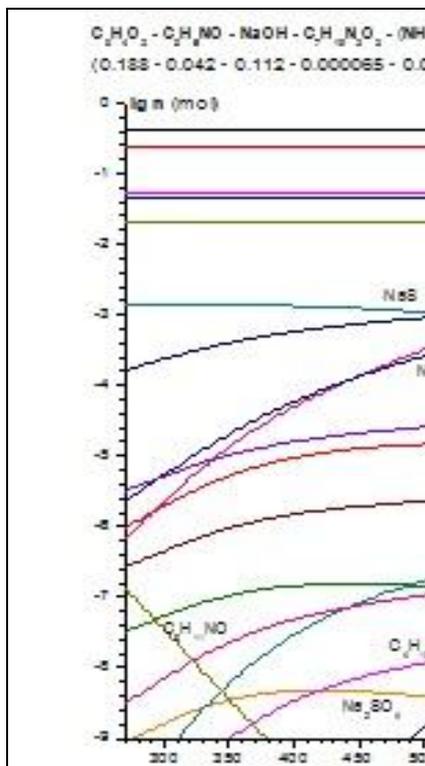


Рис. 1. Влияние температуры на химию процессов в условиях синтеза гидрогелей

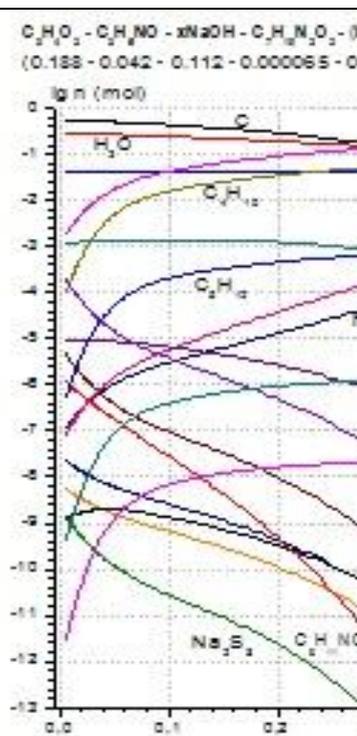


Рис. 2. Влияние нейтрализатора NaOH на химию процессов в условиях синтеза гидрогелей

Основные выводы

1. Построена достаточно общая термодинамическая модель физико-химических взаимодействий для условий синтеза органических функциональных материалов медицинского назначения в широкой области значений параметров состояния (состава, температуры, давления).

2. На основании выбора наиболее эффективных методов и компьютерных программ для реализации построенных моделей выполнен цикл оптимизационных расчетов фазово-химических превращений для условий синтеза акриловых гидрогелей в широкой области составов и

температур, обладающих высокими ранозаживляющими, восстанавливающими, сорбционными свойствами.

3. Полученные результаты моделирования и расчета позволяют выявить основные продукты взаимодействия и закономерности влияния параметров состояния (состава и температуры) на характер протекающих физико-химических превращений в ходе синтеза, предсказывать эффективность их терапевтического воздействия.

4. Результаты термодинамического моделирования процесса синтеза акриловых гидрогелей дает строгую физико-химическую основу для исследования различных свойств синтезируемых материалов и соответствующих процессов (кинетики синтеза, структуры геля, его реологии и др.) и их оптимизации с целью повышения эксплуатационных (терапевтических) характеристик получаемого продукта.

5. Полученные результаты, выводы, применяемая методология исследования применимы не только к изученным объектам (медицинским гидрогелям) и условиям технологического процесса (их синтеза), но и к существенно более широкому кругу систем и процессов.

Список литературы

1. Dutta J. Synthesis and Characterization of irradiated PVA/PEG/CaCl₂Hydrogel for Wound Dressing // American Journal of Chemistry. 2012. № 2(2). P. 6–11.

2. Gils P.S., Ray D., Mohanta G.P., Manavlan R., Sahoo P.K. Designing of New Acrylic Macroporous Superabsorbent Polymer Hydrogel and its Suitability for Drug Delivery // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2009. Vol. 1. № 2. P. 43–54.

3. Slobodov A.A., Uspenskiy A.A., Olekhnovich R.O., Evdokimov A., Kremnev D. Development of thermodynamic databases for research of multicomponent natural and technological systems and processes // International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management, SGEM, IET. 2017. Vol. 17. No 42. P. 199–206.

4. Peppas N.A., Hilt JZ., Khademhosseini A., Langer R. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principlestobionanotechnology // Advanced Materials. 2006. Vol. 18. № 11. P. 1345–1360.

5. Pekel N., Sahiner N., Güven O. Hydrogels for the removal of heavy metal ions from aqueous systems // Radiation Physics and Chemistry. 2000. Vol. 59. P. 485–489.

6. Lopatin V.V., Askadskii A.A., Peregudov A.S. Structure and Properties of Polyacrylamide Gels for Medical Applications // Polymer Bulletin. 2004. Vol. 46 A. № 12. P. 425-431.

7. Olekhovich R.O., Baidakova M.V., Uspenskii A.B., Slobodov A.A., Uspenskaya M.V. Phosphorus-containing hydrogel for use in agriculture // 16th International Multidisciplinary Scientific GeoConference «Surveying Geology and Mining Ecology Management» (SGEM-2016). Proceed. Albena Resort, Bulgaria. 28 June-7 July, 2016. Vol. 2. P. 249–255.

8. Будтова Т.В., Сулейменов И.Е., Френкель С.Я. Сильнонабухающие полимерные гидрогели — некоторые современные проблемы и перспективы (обзор) // Журнал прикладной химии. 1997. Т. 70. № 4. С. 529–539.

9. Olekhovich R.O., Glazacheva E.N., Uspenskii A.B., Slobodov A.A., Uspenskaia M.V. Investigation of hydrogel on the base the phosphorus-containing acrylic copolymer for use in agriculture // International Multidisciplinary Scientific GeoConference-SGEM: 15th International Multidisciplinary Scientific Geoconference SGEM 2015. Vol. 2. No 3. P. 207–214.

10. Белов Г.В. Термодинамическое моделирование: методы, алгоритмы, программы. М.: Научный Мир. 2012. 184 с.

11. Uspensky A.B., Ralys R., Kremnev D., Radin M., Slobodov A. Thermodynamic physico-chemical modelling and calculation for the synthesis process of modern functional materials // IOP Conference Series. Materials Science and Engineering 175. 2017. 012024 (6pp) doi:10.1088/1757-899X/175/1/012024.

12. Глушко В.П. (Ред.) Термические константы веществ: Справочник в 10-ти вып. М.: АН СССР, 1965–1981.

13. Гурвич И.В. Термодинамические свойства индивидуальных веществ [Электронный ресурс] // Электронный справочник. 1978–2004. Режим доступа: <http://twt.mpei.ac.ru>.

14. NIST Chemistry Webbook [Электронный ресурс]. NIST, 1998–2017. Режим доступа: <http://webbook.nist.gov>.

15. NIST-JANAF Thermochemical Tables [Электронный ресурс]. NIST, 2013–2017. Режим доступа: <http://kinetics.nist.gov>.

16. Yaws C.L. Thermophysical Properties of Chemicals and Hydrocarbons // William Andrew. 2008. 816 p.

17. James G.S. Lange's handbook of chemistry // 16 th ed. MGH. 2005. 1623 p.

18. Wagman D.D. NBS tables of chemical thermodynamic properties: selected values for inorganic and C1 and C2 organic substances in SI units; Selected values of chemical thermodynamic properties // Wash DC : ACS, AIP, NBS. 2002. 405 p.

19. Burcat A. Third Millennium Ideal Gas and Condensed Phase Thermochemical Database for Combustion with updates from Active Thermochemical Tables [Электронный ресурс] // NSC, 2001–2017. Режим доступа: <http://www.kinetics.nsc.ru>.

20. Lide D.R. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 90th (CD-ROM Version) ed.; CRC Press/Taylor and Francis: Boca Raton, FL, 2010.

21. Karpov I.K., Kulik D.A., Chudnenko K.V. Computer technology of imitation and modelling in physico-chemical processes in geosciences: theory, results, outlooks // II International Symposium «Thermodynamics of natural processes». Abstr. Novosibirsk. 1992. P. 25.

22. Domalski E.S., Hearing E.D., Hearing V.J. NIST Estimation of the Chemical Thermodynamic Properties for Organic Compounds at 298.15 K. // NIST Standard Reference Database 18, National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, 1994. (accessed May, 2012).

23. Slobodov A., Uspensky A., Lipin V., Mischenko A. General Methodology for Thermodynamic Phase-Chemical Modeling for Energy and Resources Optimization of Modern Technologies // BIT's V Annual World Congress of Advanced Materials (WCAM-2016): Abstract Book. China, Chongqing. June 6–8. 2016. Chongqing, BIT Congress Inc.: 2016. P. 49.

24. Slobodov A.A., Uspenskiy A., Ralys R., Kremnev D. Thermodynamic modelling of phase-chemical transformations as the method for study of rheological properties of substances // *Építőanyag* — Journal of Silicate Based and Composite Materials. Vol. 67. No 4. 2015. P. 159–163.

25. Slobodov A.A., Uspenskiy A.B., Yavshits S.G., Lipin V.A., Kritskiy V.G. Thermodynamic modeling of phase-chemical transformations and equilibrium in multicomponent natural and industrial waters // *WIT Transactions on Engineering Sciences*. Vol. 115. 2017. P. 35–42.

УДК 543.89

Труханова Ю.А., Алексеева Г.М., Куваева Е.В.
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
truhanova.yuliya@pharminnotech.com

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОГО АНАЛЬГЕЗИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА

В статье описана разработка методики количественного определения методом спектроскопии ядерно-магнитного резонанса для нового анальгезирующего средства — 2-({[4-нитрофенил]имино}(фенил)метил)изоиндолин-1,3-диона.

Ключевые слова: ЯМР-спектроскопия, количественное определение, анальгезирующее средство.

Trukhanova Yu.A., Alekseeva G.M., Kuvaeva E.V.
St. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy,
St. Petersburg, Russia

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF A NEW ANALGESIC

The article describes the development of a technique for quantitative determination by nuclear magnetic resonance spectroscopy for a new analgesic agent — 2-({[4-nitrophenyl]imino}(phenyl)methyl)isoindoline-1,3-dione.

Keywords: NMR spectroscopy, quantitative determination, analgesic.

Одной из задач при создании новых лекарственных средств является разработка методик контроля качества для наиболее перспективных молекул, обладающих выраженным фармакологическим действием. Одним из основных показателей для контроля качества новых молекул является количественное определение. Наиболее часто используемыми методами оценки количественного содержания для новых соединений являются титриметрические методы и метод баланса масс [1]. В качестве альтернативного метода количественного определения может быть предложен метод ЯМР-спектроскопии, включенный в ГФ РФ (ОФС.1.2.1.1.0007.15).

Целью работы стала разработка методики количественного определения для нового анальгезирующего средства, 2-({[4-

нитрофенил]имино}(фенил)метил)изоиндолин-1,3-диона, методом ЯМР-спектроскопии.

Материалы и методы

2-({[4-нитрофенил]имино}(фенил)метил)изоиндолин-1,3-дион синтезирован на кафедре органической химии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета.

Спектры ЯМР ^1H растворов в ДМСО- d_6 регистрировали на спектрометре Bruker Avance III 400,13 МГц с использованием остаточного сигнала дейтерированного растворителя как внутреннего стандарта.

Приготовление растворов для анализа по показателю «Количественное определение» методом ЯМР-спектроскопии

В мерную колбу вместимостью 5,0 мл помещают около 50 мг (точная навеска) стандартного образца 1-(фенил{фенилимино}метил)пирролидин-2,5-диона [2, 3], добавляют около 50 мг (точная навеска) 2-({[4-нитрофенил]имино}(фенил)метил)изоиндолин-1,3-диона. Вносят 3,0 мл диметилсульфоксида- d_6 , перемешивают до полного растворения навески и доводят объем до метки диметилсульфоксидом- d_6 , перемешивают. Отбирают при помощи дозатора по 0,5 мл испытуемого раствора и переносят в ампулы для ЯМР-спектроскопии. Снимают ЯМР-спектры.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлен ЯМР-спектр, полученный субстанции 2-({[4-нитрофенил]имино}(фенил)метил)изоиндолин-1,3-диона. Расчет проводили по методу внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта был взят аттестованный стандартный образец 1-(фенил{фенилимино}метил)пирролидин-2,5-диона [2, 3], имеющий схожее строение с аттестуемой субстанцией.

Для расчетов были выбраны интегральные интенсивности дублетных сигналов от одинаково расположенных в обеих структурах протонов бензольного кольца (см. рис. 1). Расчеты проводили согласно ГФ РФ (ОФС.1.2.1.1.0007.15) (табл. 1):

$$X, \% = 100 * \left(\frac{S * M * a_0}{S_0 * M_0 * a} \right),$$

где: S — интегральная интенсивность дублета сигнала определяемого вещества; S_0 — интегральная интенсивность дублета сигнала стандартного образца; M — молекулярная масса определяемого веще-

ства; M_0 — молекулярная масса стандартного образца; a — навеска определяемого вещества; a_0 — навеска стандартного образца.

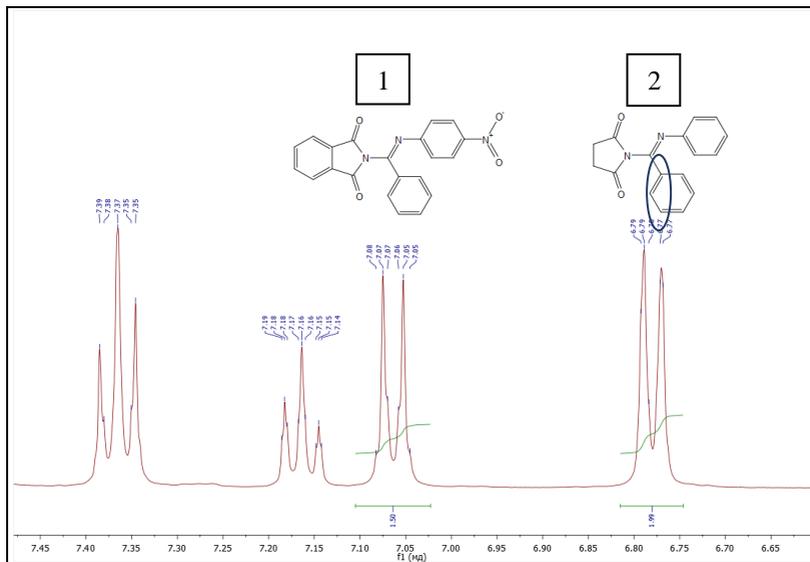


Рис. 1. Спектр ЯМР количественного определения ^1H в DMSO-d_6 (400.13 МГц); **1** — 2-({[4-нитрофенил]имино})(фенил)метил)изоиндолин-1,3-дион; **2** — CO 1-(фенил {фенилимино} метил)пирролидин-2,5-диона

На полученном спектре наблюдается высокое разрешение между сигналами стандартного образца и сигналами аттестуемого образца.

Таблица 1. Результаты анализа 2-({[4-нитрофенил]имино})(фенил)метил)изоиндолин-1,3-диона по показателю «Количественное определение» методом ЯМР-спектроскопии

№ пробы	Результат (P), %	Статистическая обработка
1	99,39	$\bar{P} = 99,7\%$ $SD=0,84$ $RSD=0,8\%$
2	99,27	
3	99,05	
4	98,95	
5	100,80	
6	100,71	

Как видно из табл. 1, значение содержания основного вещества в субстанции определяли по результатам спектрометрии 6 проб. Средний результат содержания основного вещества составил 99,7%. Относительное стандартное отклонение (RSD) составило 0,8%.

С учетом коэффициента Стьюдента (2,571), односторонний относительный доверительный интервал составляет 2,1%, поэтому для количественного определения субстанции 2-({[4-нитрофенил]имино}(фенил)метил)изоиндолин-1,3-диона по данной методике рекомендован интервал от 97,5 до 102,5%.

Заключение и выводы

Разработана методика количественного определения методом ЯМР-спектроскопии для нового анальгезирующего средства. Определено содержание основного вещества (99,7±0,8%) и установлен двусторонний доверительный интервал методики.

Список литературы

1. Epstein N.A. On certification of reference materials in pharmacy: mass balance method // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2017. Vol. 51. No 10. P. 48–57. DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-10-48-57.

2. Trukhanova Y.A., Alekseeva G.M., Yakovlev I.P., Spiridonova D.V. Attestation of the primary standard sample of a new analgesic agent 1-phenyl (phenylimino)methylpyrrolidine-2,5-dione, development and validation of a method for quantitative determination of the substance by HPLC // *Microchemical Journal.* 2022. Vol. 173. P. 106991. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106991.

3. Труханова Ю.А. Аттестация первичного стандартного образца нового анальгезирующего средства 1-фенил{фенилимино}метилпирролидин-2,5-диона. Сб мат. XII Всероссийской науч. конф. студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация — потенциал будущего, тезисы. 2022. С. 294–297.

УДК 547.745

Труханова Ю.А., Куваева Е.В., Яковлев И.П.
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-
фармацевтический университет»,
Санкт-Петербург, Россия
truhanova.yuliya@pharminnotech.com

СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИФЕНИЛГУАНИДИНА, ОБЛАДАЮЩИХ ВЫСОКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ БИОАКТИВНОСТИ

*В статье описан синтез новых производных дифенилгуанидина, на основе реакции последнего с янтарным или фталевым ангидридами. Для полученных соединений проведен первичный скрининг биологической активности методом *in silico*.*

Ключевые слова: производные дифенилгуанидина, янтарный ангидрид, фталевый ангидрид, скрининг.

Trukhanova Yu.A., Kuvaeva E.V., Yakovlev I.P.
St. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy,
St. Petersburg, Russia

DIPHENYLGUANIDINE DERIVATIVES AS NEW ANTINOXIC AGENTS

*The article describes the synthesis of new diphenylguanidine derivatives obtained by the reaction of diphenylguanidine with succinic and phthalic anhydrides. The obtained compounds were subjected to primary screening of biological activity by the *in silico* method.*

Keywords: diphenylguanidine derivatives, succinic anhydride, phthalic anhydride, screening.

Ранее нами были изучены реакции *N*-арилбезамидинов с янтарным и фталевым ангидридами [1]. Было показано, что в результате реакции происходит формирование *N*-замещенного пирролидин-2,5-дионового и изоиндолин-1,3-дионового циклов. При дальнейших исследованиях биологической активности новых синтезированных структур методом *in vivo* была выявлена высокая анальгезирующая активность данных производных, превышающая действие препарата сравнения — метамизола натрия, и вместе с тем сравнительно низкая токсичность [2].

Целью представленной работы является изучение реакций янтарного и фталевого ангидридов с дифенилгуанидином, изучение строе-

ния полученных соединений и прогнозирование их биологической активности.

Материалы и методы. Синтез целевых соединений осуществляли на стандартном лабораторном сырье квалификации х.ч.

2,5-диоксо-*N,N'*-дифенилпирролидин-1-карбоксимидамид 2.

В плоскодонную колбу объемом 250 мл помещают 0,5 г (2,4 ммоль) дифенилгуанидина **1**, 50 мл хлористого метилена и добавляют 0,28 г (2,8 ммоль) ангидрида янтарной кислоты. Реакционную смесь перемешивают в течение 5 часов, затем растворитель упаривают досуха на роторно-пленочном испарителе. Полученный осадок перекристаллизовывают из этилового спирта. Выход 82 % в пересчете на дифенилгуанидин **1**.

1,3-диоксо-*N,N'*-дифенилизондолин-2-карбоксимидамид 3

В плоскодонную колбу объемом 250 мл помещают 0,5 г (2,4 ммоль) дифенилгуанидина **1**, 50 мл толуола и добавляют 0,42 г (2,8 ммоль) ангидрида фталевой кислоты. Реакционную смесь кипятят в течение 2 часов, затем растворитель упаривают досуха на роторно-пленочном испарителе. Полученный осадок перекристаллизовывают из ацетона. Выход 69% в пересчете на дифенилгуанидин **1**.

Спектры ЯМР (ядерного магнитного резонанса) ^1H и ^{13}C растворов в дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО- d_6) регистрировали на спектрометре Bruker Avance III с использованием остаточного сигнала дейтерированного растворителя как внутреннего стандарта.

Компьютерный скрининг биологической активности проводили с помощью программы PASS, расположенной на веб-сервисе, свободно доступном через Интернет [3].

Результаты и их обсуждение. Нами установлено, что реакции дифенилгуанидина **1** с янтарным и фталевым ангидридами приводят к образованию

2,5-диоксо-*N,N'*-дифенилпирролидин-1-карбоксимидамида **2** и 1,3-диоксо-*N,N'*-дифенил-изондолин-2-карбоксимидамида **3**, соответственно (рис. 1).

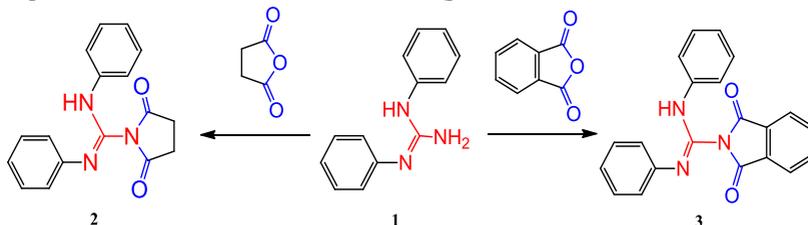


Рис. 1. Реакция дифенилгуанидина с янтарным и фталевым ангидридами

Структуры полученных соединений были продемонстрированы с помощью спектроскопии ЯМР.

В спектре ЯМР ^1H соединения **2** в ДМСО- d_6 400 МГц присутствуют сигналы протонов бензольных колец от 1,2-дифенилгуанидина (δ 7,72 (d, 2H, $J=8,0$ Гц); 7,36 (t, 2H, $J=7,8$ Гц); 7,24 (t, 2H, $J=7,9$ Гц); 7,04 (m, 2H, $J=7,4$ Гц); 6,73 (d, 2H, $J=7,7$ Гц), протон группы -NH- 9,55 (s, 1H) а также сигналы протонов метиленовых групп от янтарного ангидрида 2,73 (dd, $J=4,6, 8,0$ Гц, 2H), 2,54 (dd, $J=4,6, 8,0$ Гц, 2H).

Спектр ЯМР ^{13}C соединения **2** характеризуется сигналами ядер углерода бензольных колец (139,98, 136,22, 129,24, 123,56, 123,22, 121,22, 118,79 м.д.), карбонильных атомов углерода сукцинимидного цикла (175,52 м.д.) и сигналом атома углерода иминогруппы (147,76 м.д.).

В спектре ЯМР ^1H соединения **3** в ДМСО- d_6 400 МГц присутствуют сигналы протонов бензольных колец дифенилгуанидина δ 7,75 (d, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,37 (t, $J=7,8$ Гц, 2H), 7,16 (t, $J=7,7$ Гц, 2H), 7,08 (t, $J=7,4$ Гц, 1H), 6,90 (t, $J=7,4$ Гц, 1H), 6,76 (d, $J=7,4$ Гц, 2H), сигнал протона группы -NH- 9,79 (s, 1H) и сигналы протонов фталевого ангидрида 7,90 (m, 4H).

Спектр ЯМР ^{13}C этого соединения характеризуется сигналами ядер углерода бензольных колец (140,01, 135,86, 135,64, 131,07, 129,40, 129,16, 124,49, 123,51, 123,33, 121,24, 118,88, 118,81 м.д.), карбонильных атомов углерода фталимидного цикла (165,77 м.д.) и сигналом атома углерода иминогруппы (148,01 м.д.).

Согласно компьютерному скринингу, 2,5-диоксо- N,N' -дифенилпирролидин-1-карбоксимидамид **2** с высокой долей вероятности (0,440) обладает антигипоксической активностью. Для 1,3-диоксо- N,N' -дифенилизоиндолин-2-карбоксимидамида **3** данная активность не предсказана. Однако с долей вероятности 0,373 полученное соединение может быть хемосенсибилизатором.

Заключение и выводы

1. Изучены реакции дифенилгуанидина с янтарным и фталевым ангидридами, приводящие к получению 2,5-диоксо- N,N' -дифенилпирролидин-1-карбоксимидамида и 1,3-диоксо- N,N' -дифенилизоиндолин-2-карбоксимидамида.

2. Строение полученных соединений доказано с помощью спектроскопии ЯМР.

3. По результатам первичного компьютерного скрининга биологической активности *in silico*, для 2,5-диоксо- N,N' -дифенилпирролидин-1-карбоксимидамида выявлена вероятность проявления антигипоксической активности, для 1,3-диоксо- N,N' -дифенилизоиндолин-2-карбоксимидамида — хемосенсибилизирующей.

Список литературы

1. Trukhanova Y.A. An efficient synthesis and characterization of novel (Z)-1-phenyl(phenylimino)methylpyrrolidine-2,5-dione derivatives as potential analgesic agents/Y.A. Trukhanova, D.A. Kolesnik, I. P. Yakovlev, D.V.Spiridonova, V.N. Yuskovets, E.V. Kuvaeva, G.V. Ksenofontova, T.L. Semakova // Chemical Data Collections. 2021. Vol. 35. 100770. DOI: 10.1016/j.cdc.2021.100770.

2. Труханова Ю.А., Колесник Д.А., Яковлев И.П., Куваева Е.В., Потапова А.Э., Щеголев А.Е., Федорова Е.В. Синтез новых производных пирролидин-2,5-диона, обладающих анальгезирующей активностью // Бутлеровские сообщения. 2022. Т. 70. № 4. С. 14–20. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/22-70-4-14.

3. PASS Online. Way2Drug: [веб-ресурс]. Москва. URL: www.way2drug.com/PASSOnline (дата обращения 01.08.2022). Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. Текст: электронный.

УДК 547.78

**Фадеева В.И.¹, Рябухин Д.С.^{1,2}, Политанская Л.В.³, Романов В.Е.³,
Трошкова Н.М.³, Васильев А.В.¹**

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
лесотехнический университет им. С.М. Кирова»,
Санкт-Петербург, Россия

²ВНИИПД — филиал «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН,
Санкт-Петербург, Россия

³ФГБОУ ВО «Новосибирский институт органической химии
им. Н.Н. Ворожцова» СО РАН
Новосибирск, Россия
veronika2001@list.ru

СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ФТОРИРОВАННЫХ 2-ГИДРОКСИМЕТИЛБЕНЗИМИДАЗОЛОВ С БЕНЗОЛОМ В CF_3SO_3H

Взаимодействие фторированных 2-гидроксиметилбензимидазолов с бензолом в суперкислоте Бренстеда CF_3SO_3H приводит к образованию соответствующих продуктов реакции Фриделя–Крафтса — 2-фенилметилбензимидазолов с высокими выходами. Основываясь на этом подходе суперэлектрофильной активации органических соединений, мы разработали синтетический метод модификации структуры бензимидазолов, находящихся активное применение в медицине.

Ключевые слова: фторированные бензимидазолы, трифторметансульфоновая кислота, реакция Фриделя–Крафтса.

**Fadeeva V.I.¹, Ryabukhin D.S.^{1,2}, Politanskaya L.V.³,
Romanov V.E.³, Troshkova N.M.³, Vasilyev A.V.¹**

¹*St. Petersburg State Forestry Engineering University n.a. S.M. Kirov,
St. Petersburg, Russia*

²*All-Russia Research Institute for Food Additives — Branch of
V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS
St. Petersburg, Russia*

³*N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS
Novosibirsk, Russia*

SYNTHESIS OF NEW BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES BASED ON THE REACTION OF FLUORINATED 2-HYDROXYMETHYL BENZIMIDAZOLES WITH BENZENES IN CF₃SO₃H

Interaction of fluorinated 2-hydroxymethylbenzimidazoles with benzene in Bronsted superacid CF₃SO₃H leads to formation of corresponding Friedel–Crafts reaction products, 2-phenylmethyl benzimidazoles in high yields. Based on this approach of superelectrophilic activation of organic compounds, we have developed a synthetic procedure for modification of benzimidazole structures, which are actively used in medicine and materials science.

Keywords: *fluorinated benzimidazoles, triflic acid, Friedel–Crafts reaction.*

Для медицины важен поиск новых соединений, которые могут превзойти по фармакологическим свойствам уже известные препараты. Одним из таких соединений является бензимидазол, играющий важную роль в области медицинской химии. Благодаря тому, что производные бензимидазола обладают различными видами биологической активности и сам бензимидазольный скаффолд схож со структурой нуклеотидов, синтезу таких производных уделяется большое внимание. Так, скрининг структур на основе бензимидазола, привел к выпуску большой серии лекарственных препаратов, включая противоопухолевые средства, противопаразитные, антигистаминные и антибактериальные препараты [1].

Ранее, в работе [1] разработан метод синтеза фторированных (бензо[d]имидазол-2-ил)метанолов. Поскольку фторорганические производные обладают различной биологической активностью и играют значительную роль в разработке новых лекарственных средств, синтез фторированных соединений является перспективным направлением в области поиска и создания новых лекарственных препаратов.

Ранее в нашей научной группе разработан метод функционализации боковой цепи 2-гидроксибензимидазола путем его реакции с ароматами в суперкислоте Бренстеда $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ (TfOH, трифторметансульфоновая кислота) [2].

В данной работе исследовали реакции фторзамещенных 2-гидроксиметилбензимидазолов с бензолом в TfOH. Найдено, что эти взаимодействия протекают в довольно жестких условиях при 140°C и за 2.5 ч приводят к получению продуктов алкилирования бензола по Фриделю-Крафтсу **1a-e** с выходами 60–75% (рис. 1).

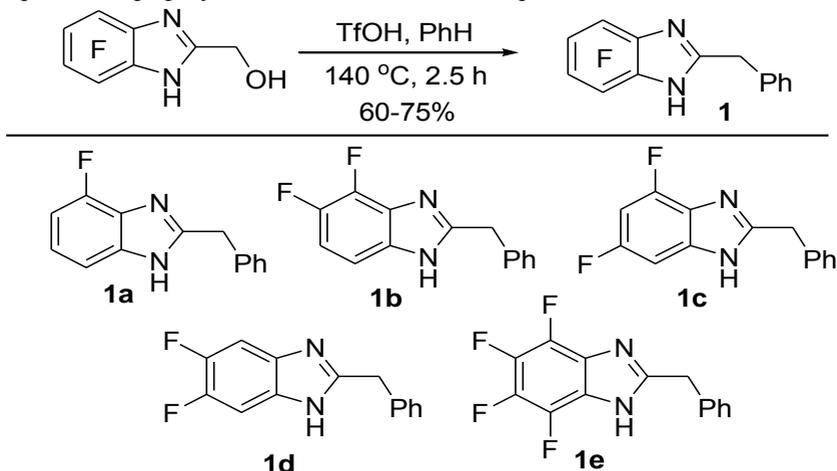


Рис. 1. Реакции фторированных 2-гидроксиметилбензимидазолов с бензолом в TfOH, приводящие к веществам **1a-e**

Полученные новые фторированные производные бензимидазольного ряда **1a-e** представляют интерес в качестве потенциальных биологически активных веществ для фармакологии.

Список литературы

1. Romanov V., Tretyakov E., Selivanova G., Li J., Bagryanskaya I., Makarov A., Luneau D. Synthesis and Structure of Fluorinated (Benzo[d]imidazol-2-yl)methanols: Bench Compounds for Diverse Applications // Crystals. 2020. V. 10. No 9. P. 786.
2. Ryabukhin D.S., Turdakov A.N., Soldatova N.S., Kompanets M.O., Ivanov A.Yu., Boyarskaya I.A., Vasilyev A.V. Reactions of 2-carbonyl- and 2-hydroxy(or methoxy)alkyl-substituted benzimidazoles with arenes in the superacid $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$. NMR and DFT studies of dicationic electrophilic species // Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2019. No 15. P. 1962–1973.

Фандо Г.П.

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

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ АНДРОСТАНА

Исследованы методы синтеза 13,14-секо аналогов андрогенов. Наиболее эффективный способ получения 13,14-секостероидов — радикальная фрагментация 14 α -гидроксипроизводных, содержащих кето-группу при C₁₇, под действием тетраацетата свинца в присутствии йода. Синтезированные соединения могут быть использованы для поиска новых лекарственных препаратов.

Ключевые слова: *стероиды, секостероиды, радикальное окисление.*

Fando G.P.

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

STUDY OF RADICAL OXIDATION OF ANDROSTENE DERIVATIVES

Methods for the synthesis of 13,14-seco androgen analogs have been investigated. The best effective approach to form 13,14 secosteroids is the radical oxidation of 14 α -hydroxy derivatives containing oxo group at C₁₇ by lead tetraacetate in the presence of iodine. The synthesized steroids can be used to search for new medicines.

Key words: *Steroids, seco steroids, radical oxidation.*

Одна из актуальных задач химии природных соединений — поиск новых биологически активных соединений среди секостероидов. Секостероиды привлекают значительный интерес из-за широкого спектра биологического действия. Они проявляют высокую токсичность к опухолевым клеткам [1], являются ингибиторами воспалительных процессов [2] и эффективными антигистаминными и антипролиферативными агентами [3]. Многие из выделенных стероидов и их метаболитов являются биологически активными веществами, что позволяет рассматривать их как потенциальные препараты для медицины и сельского хозяйства. В настоящее время активно ведется поиск новых противопухолевых соединений [4,5], в то время как другие типы дейст-

вия этих веществ остаются неизученными. Научный интерес, проявляемый к изучению методов синтеза 13,14-секо производных андростана, вызван тем, что биологическая активность может зависеть от наличия тетрациклического стероидного скелета [6, 8].

Опубликованны работы, посвященные радикальному окислению C₁₃-C₁₄ секостероидов [7], но препаративная ценность описанных методов синтеза оказалась сравнительно невысокой и попыток дальнейших модификаций полученных интермедиатов и синтеза аналогов природных гормонов не предпринималось. Необходимым условием решения проблемы доступности 13,14-секостероидов является выбор должным образом функционализированных исходных стероидов. В настоящей работе для их получения использовали продукт микробиологического окисления андростенолона — соединение **1**.

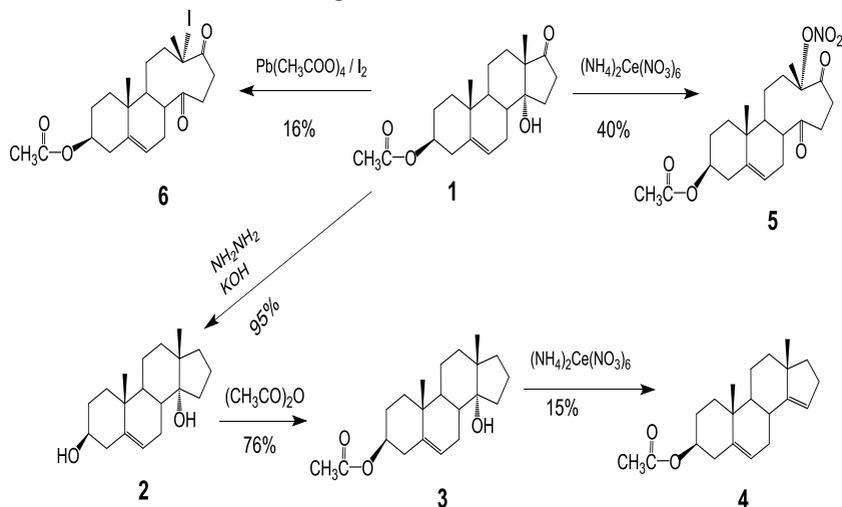


Рис. 1.

Была исследована реакция радикального окисления 14α-гидроксипроизводных, содержащих различные заместители при C₁₇, используя тетраацетат свинца и церий аммоний нитрат в качестве окислителей. Исходным соединением для синтеза 13,14-секостероидов в настоящей работе являлся 3β-ацетоксиандрост-5-ен-14α-ол **1** (рис. 1).

В результате реакции окисления 17-оксо стероида **1** церий аммоний нитратом получили 13,14-секостероид **5** с выходом 40%. В случае 17-незамещенного 14α-гидрокси стероида **3** аналогичное окисление привело к образованию довольно сложной смеси соединений, из которой

удалось идентифицировать лишь один продукт как Δ^{14} -олефин **4** (выход 15%).

Дальнейшая исследовательская работа была направлена на получение новых 13,14-секостероидов с помощью тетраацетата свинца. Для этой цели первоначально были использованы те же соединения, что и для радикального окисления с церий аммоний нитратом (рис. 2).

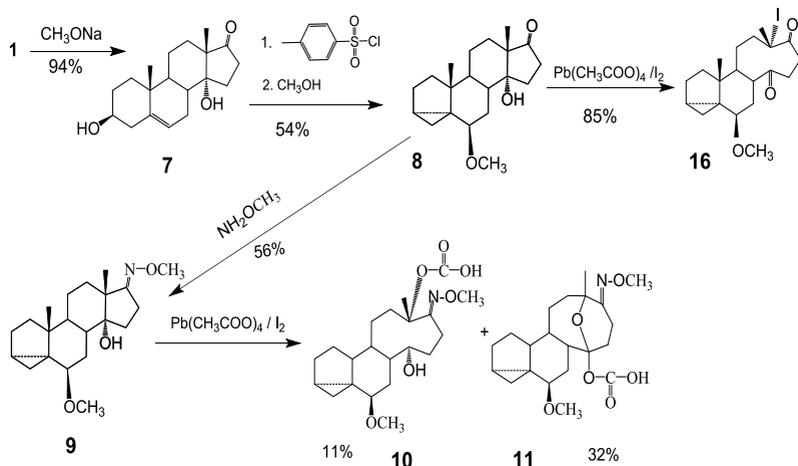


Рис. 2.

Радикальное окисление оксима **9** тетраацетатом свинца привело к образованию смеси из двух соединений (рис. 2). Один из них по полярности на ТСХ совпадал с исходной смесью, другой — более полярный. Менее полярный продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии и идентифицирован как соединение **11**. В ВРМС метилоксима **10** присутствует пик m/z 405.2510, соответствующий формуле $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_5$. Пик с m/z 405.2515, соответствующий формуле $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_5$ наблюдался и для соединения **11**, а также пик иона с m/z 345.2303, содержащий фрагмент $[\text{M}^+ - \text{AcOH}]$. Наиболее вероятный механизм образования продукта **11** показан на рис. 3.

Реакция 14α -гидрокси производных **12** с тетраацетатом свинца или церий аммоний нитратом протекает с промежуточным образованием радикала **13**, который далее превращается в **14** в результате β -расщепления, что может привести к ряду продуктов с модифицированным углеродным скелетом в зависимости от заместителя при C_{17} . Очевидно, что образование соединения **11**, содержащее трансануляр-

ный эпоксидный мостик, включает превращение радикала **14** в **15**. Последующая реакция с ацетокси радикалом приводит к образованию продукта **11**.

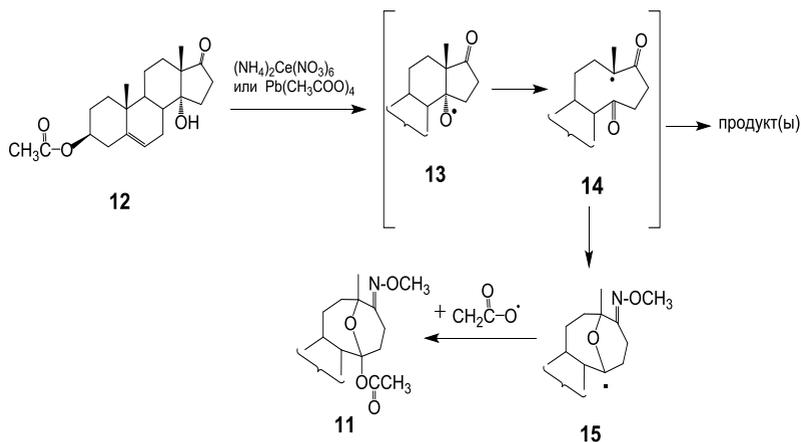


Рис. 3.

Анализ схемы радикального окисления 14 α -гидроксистероидов (рис. 3) позволил сделать предположение, что наличие при C₁₇ заместителя, который бы стабилизировал радикал **14**, позволило бы добиться повышения выхода целевых 13,14-секостероидов. Поставленную задачу могла выполнять кето-группа при C₁₇. Однако выше уже упоминалось, что окисление **1** тетраацетатом свинца привело к 13,14-секостероиду **6** с выходом всего 16%. Было сделано предположение, что низкий выход данной реакции обусловлен нестабильностью 3 β -ацетокси- Δ^5 -системы в условиях радикального окисления тетраацетатом свинца. Действительно, радикальное окисление соединения **8** в аналогичных условиях привело к 13,14-секостероиду **16** с выходом 85% (рис. 2), структура которого была установлена при использовании рентгеноструктурного анализа, так как использование ЯМР-спектроскопии не позволило однозначно определить расположение йода и метильной группы при C₁₃.

Для доказательства структуры полученных соединений использование ЯМР-спектроскопии не позволило однозначно определить расположение йода и метильной группы при C₁₃. Наиболее полная и убедительная информация могла быть получена при использовании рент-

геноструктурного анализа. Получить соответствующие кристаллы удалось для стероида **16**. Рентгеноструктурный анализ данного соединения позволил однозначно установить конфигурацию C₁₃-центра, а также девятичленного цикла данной молекулы в кристалле.

Вывод. Осуществлен синтез практически неисследованной ранее группы соединений — 13,14-секостероидов. Показано, что реакция радикального окисления 14 α -гидроксистероидов дает сложные смеси соединений. Наиболее эффективным способом получения 13,14-секостероидов является радикальная фрагментация 14 α -гидроксипроизводных, содержащих кето-группу при C₁₇, под действием тетраацетата свинца в присутствии йода. Приписание конфигураций центров C₁₃, C₁₄, C₁₇ всех соединений данной серии базировалось на основании данных рентгеноструктурного анализа.

Список литературы

1. Physalins V-IX, 16,24-*cyclo*-13,14-*seco* withanolides from *Physalis angulate* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities / Sun, C-P. [et al.] // Sci. Rep. 2017. № 7. P. 4057.
2. Jia-Jia Fana et al. A Novel Cytotoxic Physalin from *Physalis angulata* // Nat. Prod. Commun. 2017. Vol. 12. P. 1589–1591.
3. Cássio S. Meira et al. Physalins B and F, *seco*-steroids isolated from *Physalis angulata* L., strongly inhibit proliferation, ultrastructure and infectivity of *Trypanosoma cruzi* // Parasitology. 2013. Vol. 140. P. 1811–1821.
4. Ivana kuzminac et al. Structural analysis and antitumor potential of novel 5,6-disubstituted-17 α -homo-17-oxa-androstane derivatives // Journal of Structural Chemistry. 2017. № 28. P. 567–576.
5. Izabella Sinka et al. Antiproliferative and antimetastatic properties of 3-benzyloxy-16-hydroxymethylene-estradiol analogs against breast cancer cell lines // European Journal of Pharmaceutical Science. 2018. № 123. P. 362–370.
6. Фандо Г.П. Биологическая активность секостероидов, выделенных из природных источников // Медицинский журнал. 2016. № 1. С. 69–72.
7. Bjelaković M.S. et al. 13,14-*Seco*-steroids: a new type of modified steroids containing a nine-membered ring // Helvetica Chimica Acta. 1999. Vol. 82. P. 707–721.
8. Фандо Г.П., Жабинский В.Н., Хрипач В.А. Секостероиды: выделение, структура, свойства // Биорегуляторы: исследование и применение. Вып. 2. Минск: Белорусская наука, 2008. С. 53–69.

УДК 541.49+577.323.23

**Феоктистова В.А.¹, Немеш М.В.¹, Новикова Т.А.¹,
Плеханов А.Ю.^{2,3}, Пузык М.В.¹**

¹ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический
университет им. А.И. Герцена»

²Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина,

³Институт высокомолекулярных соединений РАН,
Санкт-Петербург, Россия
vik.feok.108@mail.ru

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСОВ Pd(II) С ДНК

В статье представлены спектральные исследования взаимодействия циклометаллированных комплексов Pd(II) с ДНК. На основании анализа спектров поглощения продуктов реакции водных растворов комплексов Pd(II) с ДНК предложен механизм.

Ключевые слова: комплексы Pd(II), нильский красный, метиловый эфир цинхофена, ДНК, интеркаляция.

**Feoktistova V.A.¹, Nemesh M.V.¹, Novikova T.A.¹,
Plekhanov A.Yu.^{2,3}, Puzyk M.V.¹**

¹Herzen University,

²V.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, NRC
"Kurchatov Institute" Gatchina,

³Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
St Petersburg, Russia
vik.feok.108@mail.ru

SPECTRAL RESEARCH OF THE INTERACTION OF Pd(II) COMPLEXES WITH DNA

The article presents spectral studies of the interaction of Pd(II) cyclometallated complexes with DNA. Based on the analysis of the absorption spectra of the reactions of aqueous solutions of Pd(II) complexes with DNA, a mechanism has been proposed.

Keywords: Pd(II) complexes, Nile red, methyl ester of cinchophene, DNA, intercalation.

Согласно сведениям Всемирной организации здравоохранения, рак — это одна из ведущих причин смерти в мире, которая в 2020 г. унесла жизни почти 10 млн человек, т.е. каждого шестого умершего.

Также известно, что при своевременном выявлении многие виды рака излечимы. Поэтому поиск новых препаратов для химиотерапии является актуальной задачей.

В 1969 г. группа под руководством Б. Розенберга сообщила об открытии противоопухолевой активности хлор-амминных комплексов платины [1], а через десятилетие (1979 г.) цисплатин стал важным компонентом химиотерапии для лечения рака яичников, яичек, легких и мочевого пузыря, а также лимфом, миелом и меланомы. К сожалению, его дальнейшее использование сильно ограничено серьезными побочными эффектами, сокращающими дозу, и врожденной или приобретенной лекарственной устойчивостью [2].

В начале 1960-х годов Л. Лерман высказал гипотезу о возможности встраивания некоторых лекарств между соседними азотистыми основаниями ДНК [3]. Позже во множестве работ было установлено, что структура ДНК деформируется при интеркалировании в нее, но и стабилизируется за счет ван-дер-ваальсовых и гидрофобно-гидрофильных взаимодействий с веществом-интеркалятором. В середине 1970-х годов группа Липпарда сообщает о нековалентном взаимодействии между катионами металлокомплексами-интеркаляторами (этилендиаминовые комплексы Pt(II) с дииминовыми лигандами: 2,2'-бипиридил, 1,10-фенантролин) и основаниями ДНК [4, 5]. Данные катионные комплексы имеют плоскоквадратную структуру, а поэтому эффективно интеркалируются в ДНК. В настоящее время факт интеркаляции доказан множеством инструментальных методов: рентгено-дифракционными, дифракцией упругих нейтронов, гель-электрофорезом, изотермической титриметрической калориметрией, ИК-линейным дихроизмом, двумерным ЯМР [6]. Поэтому в качестве интеркалирующего стандартного вещества мы выбрали хорошо описанный в литературе (бипиридил)этилендиаминплатины (II) хлорид, далее [PtEnBpy]Cl₂ (рис. 1, а).

30 лет на кафедре неорганической химии РГПУ им. А.И. Герцена изучают циклометаллированные комплексы металлов платиновой группы. Циклометаллирующие лиганды — это ароматические молекулы, подобные 2,2'-бипиридилу и 1,10-фенантролину. Комплексы Pt(II) и Pd(II) имеют аналогичную плоско-квадратную структуру и nd^8 -электронную конфигурацию центрального иона. Поэтому в данной работе мы приводим результаты новых спектральных исследований взаимодействия комплексных катионов [PdEnC^N]⁺ (рис. 1, б–в) с ДНК, где En — этилендиамин, C^N — депротонированная молекула метилового эфира цинхофена (в тексте будем обозначать Mpc) или Нильского красного (в тексте — NR).

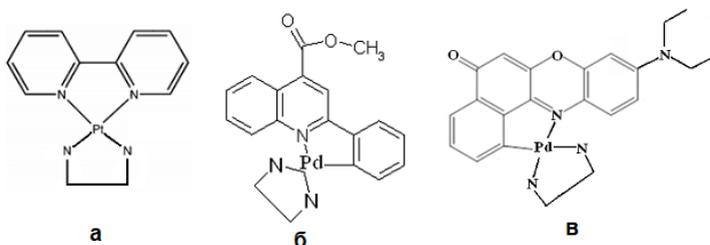


Рис. 1. Структурные формулы катионных комплексов: *a* — $[\text{PtEnVpy}]^{2+}$, *б* — $[\text{PdEnMpqc}]^+$, *в* — $[\text{PdEnNR}]^+$

Экспериментальная часть. Комплексы Pd (II) синтезировали по общей многостадийной методике [7]. На первой стадии ацетат Pd (II) растворяли в уксусной кислоте и наблюдали образование раствора коричневого цвета (уравнение 1, OAc — ацетат ион).

1. $\text{PdOAc}_2 + 2\text{CH}_3\text{COOH} = \text{H}_2[\text{PdOAc}_4]$.
2. $2\text{H}_2[\text{PdOAc}_4] + 2\text{HC}^{\wedge}\text{N} = [\text{PdC}^{\wedge}\text{N}(\mu\text{-OAc})_2]_2 + 2\text{CH}_3\text{COOH}$.
3. $[\text{PdC}^{\wedge}\text{N}(\mu\text{-OAc})_2]_2 + 2\text{En} = 2[\text{PdEnC}^{\wedge}\text{N}]\text{OAc}$.
4. $[\text{PdEnMpqc}]\text{OAc} + \text{NaClO}_4 = [\text{PdEnMpqc}]\text{ClO}_4 + \text{NaOAc}$.

Далее к полученному раствору добавляли эквивалентное количество лиганда ($\text{C}^{\wedge}\text{N} = \text{Mpqc}$ или NR). Наблюдали мгновенное изменение цвета раствора и постепенное выпадение осадка — мостикового ацетатного комплекса $[\text{PdC}^{\wedge}\text{N}(\mu\text{-OAc})]$ (уравнение 2). Через 12 ч собирали на фильтре, промывали этанолом и сушили на воздухе. Выход димера составил ~ 95%. На последней стадии к водной суспензии димера прикапали эквивалентное количество этилендиамина (уравнение 3). Наблюдали растворение димера и изменение цвета раствора (он становился более светлым). Раствор, содержащий $[\text{PdEnNR}]\text{OAc}$, медленно упарили и сушили на воздухе. Выход составил 99%. Применить аналогичную процедуру для комплекса $[\text{PdEnMpqc}]\text{OAc}$ не удалось, так как вещество оказалось очень гигроскопичным, поэтому к водному раствору добавили избыток раствора перхлората натрия (уравнение 4). Наблюдали мгновенное образование осадка, который собирали на фильтре, промывали и сушили на воздухе. Выход комплекса — 65%.

Синтез комплекса $[\text{PtEnVpy}]\text{Cl}_2$ осуществили по следующей методике. К насыщенному водному раствору тетрахлороплатинита калия добавили этанольный насыщенный раствор, содержащий эквивалентное количество 2,2-бипиридила. Наблюдали мгновенное выпадение осадка $[\text{PtVpyCl}_2]$. Осадок собрали на фильтре, промыли водой и сушили на воздухе. Далее в горячую водную суспензию $[\text{PtVpyCl}_2]$ доба-

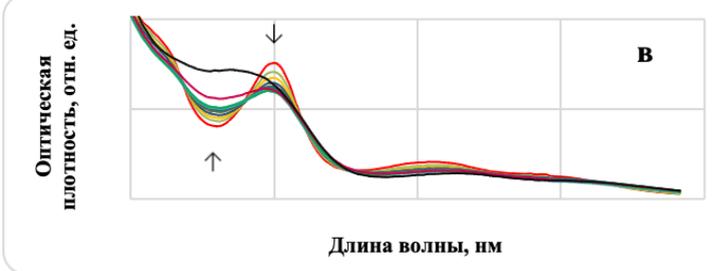
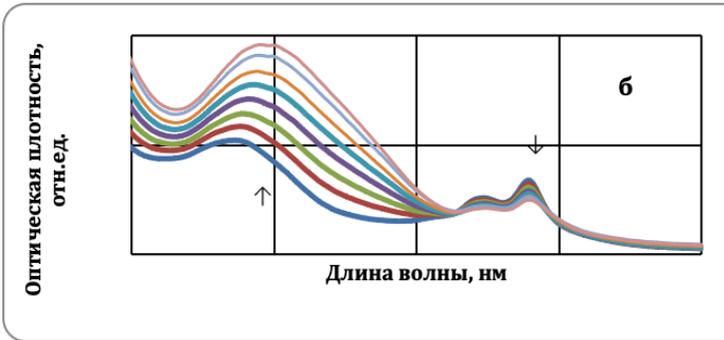
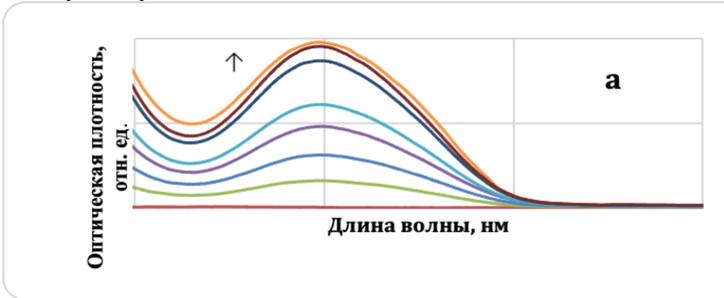
вили этилендиамин до полного растворения осадка. После чего раствор медленно упарили до начала образования осадка. Смесь охладили, осадок собрали на фильтре, промыли и сушили на воздухе. Выход комплекса $[\text{PtEnVpy}]\text{Cl}_2$ составил 90%.

ДНК из тимуса теленка приобретен в Sigma Chemical Company.

Физико-химические исследования комплексов (и их идентификация) выполнены при комнатной температуре на оборудовании ЦКП факультета химии РГПУ им. А.И. Герцена: ИК-спектры веществ в таблетках KBr в диапазоне $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ — на ИК-Фурье спектрометре Shimadzu IR-Prestige 21; спектры ЯМР ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ и $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ NMQC, $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ NOESY — на спектрометре Jeol JNM-ECX400A с рабочими частотами 399.78 (^1H) и 100.53 МГц (^{13}C); электронные спектры в диапазоне 200–800 нм — на спектрофотометре СФ-2000. Взаимодействие комплексных катионов и ДНК изучали титрованием, снимая спектры поглощения (рис. 2, 3). Для этого к 2,5 мл раствора комплекса добавляли по 10 мкл водного раствора ДНК (массовая доля раствора 0,064%).

Результаты и их обсуждение. ДНК эффективно поглощает УФ-излучение в области 260 нм, обусловленное электронным внутримолекулярным (ВЛ) $\pi\text{-}\pi^*$ -переходом в пуриновых (аденин и гуанин) и пиримидиновых (тимин и цитозин) основаниях. Синтезированные нами комплексы также имеют интенсивные полосы поглощения, обусловленные ВЛ $\pi\text{-}\pi^*$ -переходами в гетероциклических ароматических лигандах (рис.2). Если бы интеркаляции не было, то в спектрах поглощения (в области поглощения ДНК) мы наблюдали бы плавное увеличение поглощения при увеличении концентрации ДНК. И такой эффект мы наблюдаем в диапазоне 220–290 нм (см. рис. 2, б). Однако, как нетрудно заметить, все спектры комплексов в начале титрования в воде в области ВЛ $\pi\text{-}\pi^*$ -переходов имеют падение поглощения. А наличие на графике нескольких изосбестических точек однозначно указывает на образование одного продукта: в нашем случае — интеркалята «комплекс металла — ДНК». Гетероциклический лиганд (Vpy, NR или Mpyc) комплекса, внедряясь между азотистыми основаниями ДНК, частично перестает поглощать свет. После интеркаляции всех катионов комплекса из воды в ДНК, в спектрах поглощения изосбестические точки исчезают, а спектр поглощения смеси ДНК и интеркалята возрастает, являясь суммой поглощений избыточной ДНК и интеркалята (комплекс металла ДНК). Лучше всего исчезновение изосбестических точек можно увидеть на рис. 2, в (два верхних спектра в области 220–280 нм). В пользу интеркаляционного механизма также может свидетельствовать хорошо известный факт [6]: изменения спектров поглощения при переходе ДНК из двухнитевой в однонитевую (явле-

ние плавления ДНК при повышении температуры раствора). Раскручивание молекулы ДНК способствует поглощению УФ-излучение все большему числу азотистых оснований.



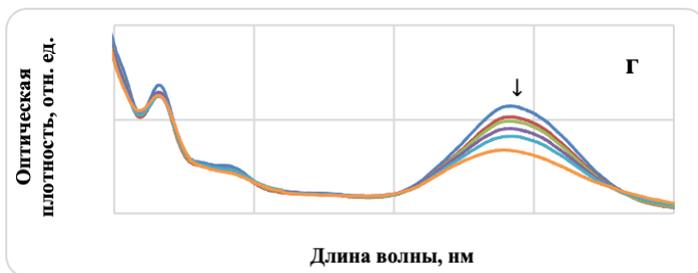
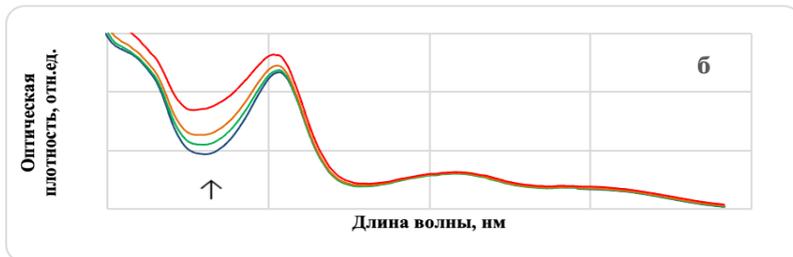
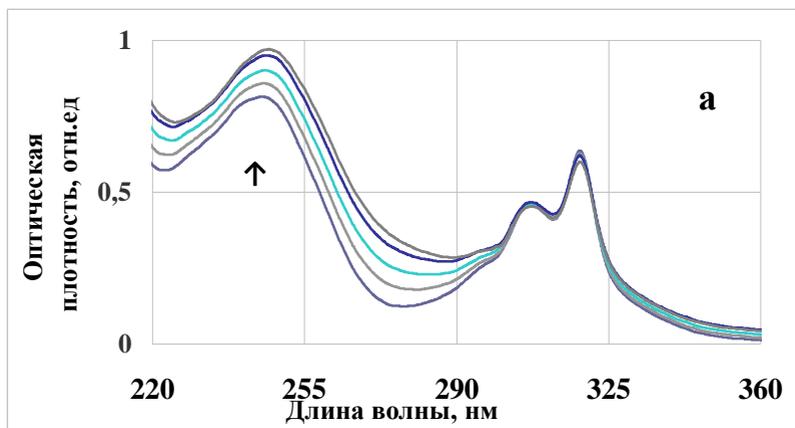


Рис. 2. Изменения спектров поглощения водных растворов при возрастании концентрации ДНК: *а* — вода, *б* — $[\text{PtEnVpy}]\text{Cl}_2$, *в* — $[\text{PdEnMpqc}]\text{ClO}_4$, *г* — $[\text{PdEnNR}]\text{OAc}$. Стрелки указывают направление изменения спектров при увеличении концентрации ДНК



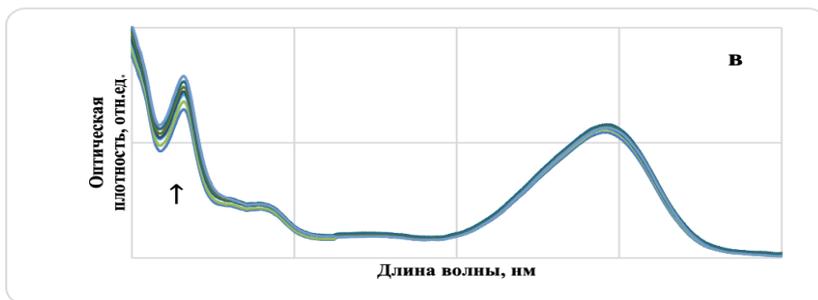


Рис. 3. Спектры поглощения водно-этанольных растворов: *а* — $[\text{PtEnVpy}]\text{Cl}_2$, *б* — $[\text{PdEnMpqc}]\text{ClO}_4$, *в* — $[\text{PdEnNR}]\text{OAc}$. Стрелки указывают направление изменения спектров при увеличении концентрации ДНК

Замена растворителя (воды на 65% водный раствор этанола) приводит к исчезновению ранее обнаруженного спектрального эффекта — эффекта интеркаляции комплексов Pt(II) и Pd(II) в ДНК (рис. 3, спектр поглощения ДНК не приводим, так как он похож на спектр поглощения в воде). Остается лишь возрастание оптической плотности для всех комплексов в области ~ 245 нм, обусловленное суммарным поглощением ДНК и комплекса.

Выводы. Совокупность проведенных экспериментов по взаимодействию ДНК с новыми этилендиаминовыми циклометаллированными (с NR или Mpqс) комплексами Pd(II) и известного из литературы интеркалянта $[\text{PtEnVpy}]\text{Cl}_2$ указывает на сходные спектральные особенности продуктов реакций. Это все позволяет судить о получении именно в водных растворах продукта интеркаляции гетероциклического лиганда (как минимум части координационного катиона) и ДНК, а также рассматривать комплексы $[\text{PdEnMpqc}]\text{ClO}_4$ и $[\text{PdEnNR}]\text{OAc}$ как перспективные соединения для изучения их противораковой активности.

Работа выполнена в рамках государственного задания при финансовой поддержке Минпросвещения России (проект № **FSZN-2020-0026**).

Список литературы

1. Rosenberg B., VanCamp L., Trosko J.E., Mansour V.H. // Nature. 1969. Vol. 222. № 4. P. 385.
2. Brodie C.R., Collins J.G., Aldrich-Wright J.R. // Dalton Trans. 2004. Vol. 111. № 8. P. 1145.

3. Lerman L.S. // Journal of Molecular Biology. 1961. № 2. P. 18.
4. Lippard S.J. // Accounts of Chemical Research. 1978. № 11. P. 211.
5. Lee S.A., Grimm HW. Pohle W., Scheiding W., L. van Dam, Song Z., Levitt M.H., Korolev N., Szabo' A., Rupprecht A. // Physical Review. 2000. Vol. 62. № 5. P. 7044.
6. Szabo A., Lee S.A. // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2008. Vol. 26. № 1.
7. Байчурин Р.И., Дуланова И.Т., Пузык А.М., Пузык М.В. // Оптика и спектроскопия. 2021. Т. 129. № 11. С. 387.

УДК 543.422.3:613.6:661.12

Чеботкова Д.В., Крымская Т.П., Лебединская К.С., Капелько И.М.
*Республиканское унитарное предприятие
«Научно-практический центр гигиены»,
Минск, Республика Беларусь
chromatographic@rspch.by*

**ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМЛОДИПИНА БЕСИЛАТА,
ПРОИЗВОДНОГО 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНА,
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ В ВОЗДУХЕ
РАБОЧЕЙ ЗОНЫ**

Разработана методика спектрофотометрического определения амлодипина бесилата в воздухе рабочей зоны. Методика измерений предназначена для применения органами и учреждениями, осуществляющими государственный санитарный надзор, контроль за безопасностью организации труда при производстве лекарственных средств на основе амлодипина бесилата.

Ключевые слова: амлодипин бесилат, спектрофотометрия, воздух рабочей зоны, антагонист кальциевых каналов.

Chebotkova D.V., Krymskaya T.P., Lebedinskaya K.S., Kapelko I.M.
*Republican Unitary Enterprise «Scientific Practical Centre Of Hygiene»,
Minsk, Belarus*

**DETERMINATION OF AMLODIPINE BESILATE, A DERIVATIVE
OF 1,4-DIHYDROPYRIDINE, BY SPECTROPHOTOMETRIC
METHOD IN THE AIR OF THE WORKING AREA**

A method of spectrophotometric determination of amlodipine besilate in the air of the working area has been developed. The measurement technique is intended for use by authorities and institutions that carry out state sani-

tary supervision, control over the safety of labor organization in the production of medicines based on amlodipine besilate.

Keywords: *amlodipine besylate, spectrophotometry, working area air, calcium channel antagonist.*

Актуальность. Амлодипина бесилат — антагонист кальциевых каналов дигидропиридинового ряда третьего поколения, по своей гипотензивной, противоишемической, антиатеросклеротической, органопротективной активности превосходит препараты первого и второго поколения. Блокирует медленные кальциевые каналы (каналы L-типа) и препятствует внутриклеточной гиперкальциемии и сокращению гладкомышечной клетки, оказывая сосудорасширяющее действие. Фармакокинетический профиль включает медленное начало действия, длительный эффект, высокую биодоступность. Представляет собой белый или почти белый порошок, легко растворимый в метаноле, умеренно растворимый в 96% спирте и мало растворимый в воде.

Вещество относится к 1-му классу опасности, основные возможные побочные действия амлодипина бесилата: артралгия, судороги мышц, миалгия, тошнота, ринит, диплопия, нарушение аккомодации, ксерофтальмия, дерматит, аллергические реакции и другие побочные эффекты. Оказывая негативное воздействие на здоровье людей, которые занимаются разработкой, анализом и производством данной фармацевтической субстанции, необходим контроль состояния воздушной среды при производстве данного лекарственного средства.

Обзор литературы показал, что существует целый ряд методик для количественного определения массовых концентраций амлодипина бесилата в дозированных формах и/или биологических жидкостях. К таким методам относятся высокоэффективная жидкостная хроматография [1, 2], газовая хроматография [3], капиллярный электрофорез [4], тонкослойная хроматография [5], высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием [6], спектрофотометрия [7-9] и спектрофлуориметрия [10].

Цель работы — разработка методики определения амлодипина бесилата в воздухе рабочей зоны спектрофотометрическим методом.

Материалы и методы исследования. Средства измерений: спектрофотометр «Cary 60», Agilent Technologies, США; весы аналитические AS220/X; термогигрометр ИВА-6Н; дозаторы Scorex Acura на различные объемы.

Реактивы и материалы: амлодипина бесилат с массовой долей основного вещества не менее 97,0%; метанол для ВЭЖХ; Фильтры аналитические аэрозольные АФА-ВП-20-1.

Выполнение измерений осуществляли при следующих условиях: температура воздуха (20 ± 5) °С; атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм ртутного столба); влажность воздуха не более 80%.

Основной раствор амлодипина бесилата с концентрацией 250 мкг/см³.

Взвешивают в бюксе 0,025 г амлодипина бесилата с точностью до $\pm 0,0005$ г. Навеску количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют от 60 до 70 см³ метилового спирта. Колбу аккуратно встряхивают до полного растворения вещества, а затем доводят до метки метиловым спиртом. Концентрация раствора составляет 250 мкг/см³.

Установление градуировочной характеристики. В работе использовали растворы амлодипина бесилата с концентрацией 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 мкг/см³, которые получали последовательным разбавлением основного раствора с массовой концентрацией 250 мкг/см³.

Градуировочную характеристику выражающую зависимость оптической плотности от массовой концентрации амлодипина бесилата в анализируемом растворе, устанавливают по пяти сериям растворов путем измерения оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 360 нм.

При построении градуировочного графика на оси абсцисс откладывают массовую концентрацию амлодипина бесилата в растворе, по оси ординат — соответствующее значение оптической плотности.

Градуировочный график подчиняется зависимости $y = a + bx$ и имеет линейную зависимость оптической плотности от массовой концентрации амлодипина бесилата в растворе в диапазоне от 10,0 до 30,0 мкг/см³ (рис. 1).

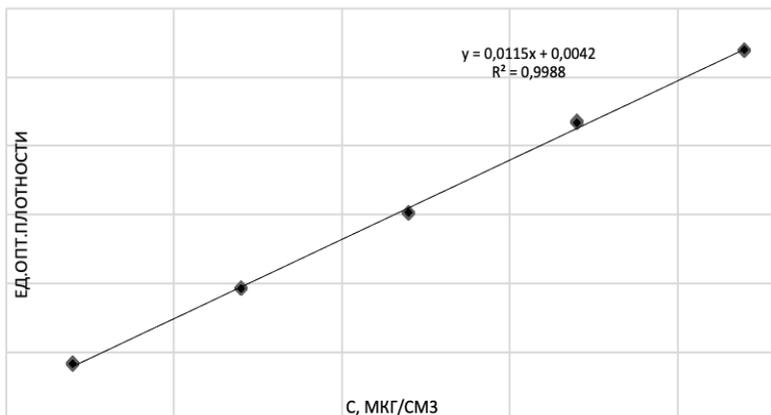


Рис. 1. Градуировочный график зависимости оптической плотности растворов от массовой концентрации амлодипина бесилата в растворе

Оптимальные условия спектрофотометрического анализа являются: основной растворитель — метанол; толщина поглощающего слоя — 1 см; температура анализа — 20 ± 5 °С; аналитическая длина волны — 360 нм.

Отбор проб. Отбор проб воздуха рабочей зоны следует осуществлять в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005. В одной точке отбирают две пробы в условиях повторяемости.

Диапазон измеряемых концентраций амлодипина бесилата в воздухе рабочей зоны составляет от 0,05 до 1,20 мг/м³ при отборе определенного объема воздуха для достижения ожидаемого уровня загрязнения.

Пробы хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре от +4 °С до +8 °С в течение 10 суток.

Результаты и их обсуждение. Фильтр с отобранной пробой помещают в стеклянный бюкс, следя за тем, чтобы сторона фильтра с пробой была обращена вверх, приливают пипеткой 10 см³ метилового спирта, аккуратно встряхивают для смачивания обеих поверхностей фильтра и оставляют на 20 минут, периодически перемешивая. Экстракцию повторяли еще раз.

Полученные экстракты объединяли и переносили в колбу-концентратор, упаривали до сухого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С. Далее сухой ос-

таток растворяли в 4 см³ метилового спирта и измеряют оптическую плотность полученного раствора в кюветах с толщиной слоя 1 см на спектрофотометре при длине волны 360 нм в сравнении с контрольной пробой, которую готовят одновременно и аналогично пробам.

Вычисление результатов анализа. Содержание амлодипина бесилата в пробах воздуха рабочей зоны (X , мг/м³) рассчитывали по формуле:

(1)

где C — массовая концентрация амлодипина бесилата в растворе, найденная по градуировочному графику, мкг/см³; V — объем раствора пробы; K_{Rec} — коэффициент экстракции, учитывающий потери при пробоподготовке, в относительных единицах; V_0 — объем воздуха, отобранный для анализа и приведенный к стандартным условиям (температура 20 °С и атмосферное давление 101,3 кПа), дм³, по формуле:

(2)

где V_t — объем воздуха, отобранный для анализа, дм³; P — барометрическое давление во время отбора пробы, кПа; t — температура воздуха во время отбора пробы, °С.

За результат анализа принимали среднее арифметическое двух параллельных измерений \bar{X} , мг/м³. Результат анализа представляется в следующем виде:

$$\text{мг/м}^3, k=2, P=95\% \quad (3)$$

где \bar{X} — результат измерений массовой концентрации амлодипина бесилата, мг/м³; U — расширенная неопределенность, мг/м³, при $k = 2, P = 95\%$ рассчитывается по формуле

(4)

Для оценки показателей прецизионности в качестве образцов для исследований использовали фильтры аналитические аэрозольные

АФА-ВП-20-1 с внесенным раствором амлодипина бесилата содержащим определенные массовые концентрации фармацевтической субстанции, имитирующие пробы воздуха. Таким образом было приготовлено 15 проб и проведено 15 единичных измерений. Правильность метода оценивается показателем степени извлечения. Степень извлечения амлодипина бесилата изучалась в процессе внутрिलाбораторных исследований в условиях повторяемости путем анализа модельных проб.

Показатели точности метода измерений массовой концентрации амлодипина бесилата в воздухе рабочей зоны от 0,05 до 1,20 мг/м³ составили: предел повторяемости — $r=12\%$, предел промежуточной прецизионности — $R_{I(TO)}=21\%$, относительная расширенная неопределенность — $U=16\%$.

Заключение. Разработана методика определения амлодипина бесилата производного 1,4-дигидропиридина, спектро-фотометрическим методом в воздухе рабочей зон. Методика измерений предназначена для применения органами и учреждениями, осуществляющими государственный санитарный надзор, контроль за безопасностью организации труда при производстве лекарственных средств на основе амлодипина бесилата.

Исследования выполнены в рамках подпрограммы 2 «Нормативно-правовая база» ГНТП «Разработка фармацевтических субстанций, лекарственных средств и нормативно-правового обеспечения фармацевтической отрасли».

Список литературы

1. Zarghi A., Foroutan S.M., Shafaati A., Khoddam A. Validated HPLC method for determination of amlodipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies // *Farmaco*. 2005. Vol. 60 (9). P. 789–792. DOI: 10.1016/J.FARMAC.2005.06.012.
2. Chitlange S.S., Imran M., Sakarkar D.M. RP-HPLC method for simultaneous estimation of amlodipine and metoprolol in tablet formulation // *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2008. Vol. 2. P. 232. DOI: 10.22377/AJP.V2I4.198.
3. Monkman S.C., Ellis J.S., Cholerton S. Automated gas chromatographic assay for amlodipine in plasma and gingival crevicular fluid // *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*. 1996. Vol. 678(2). P. 360–364. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00526-9.
4. Mohamed A.M.I., Omar M.A., Hammad M.A. et al. Development and Validation of highly Sensitive Stability Indicating Spectrofluorimetric Method for Determination of Amlodipine in Pharmaceutical Preparations

and Human Plasma // Journal of Fluorescence. 2016. P. 2141–2149. DOI: 10.1007/s10895-016-1910-4.

5. Meyyanathan S.N., Suresh B. HPTLC method for the simultaneous determination of amlodipine and benazepril in their formulations // Journal of chromatographic science. 2005. Vol. 43 2). P. 73–75.

6. Chan-Mei Lv. Determination of Amlodipine in Human Plasma by LC-MS/MS and Its Bioequivalence Study in Healthy Chinese Subjects // Pharmacology & Pharmac. 2013. Vol. 4. P. 191–200.

7. Alizadeh N., Hemati F. Spectrophotometric method for the determination of amlodipine besylate in pure and dosage forms using 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane and tetracyanoethylene // Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. 2014. Vol. 52. P. 109–114. DOI: 10.1016/J.BFOPCU.2014.01.003.

8. Sharkawi M.M., Mohamed N.R., El-Saadi M.T. Five spectrophotometric methods for simultaneous determination of Amlodipine besylate and celecoxib in presence of its toxic impurity // Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy. 2021. Vol. 263. P. 120–137. DOI: 10.1016/j.saa.2021.120137.

9. Rahman N., Azmi S.N. Spectrophotometric method for the determination of amlodipine besylate with ninhydrin in drug formulations // Farmaco. 2001. Vol. 56(10). P. 731–735. DOI: 10.1016/S0014-827X(01)01093-X.

10. Abdel-Wadood H.M., Mohamed N.A., Mahmoud A.M. Validated spectrofluorometric methods for determination of amlodipine besylate in tablets // Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy. 2008. Vol. 70(3). P. 564–570. DOI: 10.1016/J.SAA.2007.07.055.

УДК 544.08

***Широкова И.Ю., Кучук В.И., Радин М.А., Демина Е.В.,
Коledenко Д.В., Малков С.Д., Зарифи К.О.***

*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
irina.shirokova@pharmintotech.com*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ПОЛЯРИМЕТРИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ИБУПРОФЕНА

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

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

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

USING SPECTROPHOTOMETRY AND POLARIMETRY METHOD FOR IBUPROFEN ANALYSIS

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

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

Ибупрофен — (2R,S)-1[4-(2-метилпропил)фенил] пропионовая кислота — рацемическая смесь, состоящая из двух оптических изомеров право- и левовращающихся — энантиомеров S-(+) и R(-) (рис. 1). Его довольно часто применяют в настоящее время в качестве жаропонижающего, противовоспалительного и обезболивающего средства [1, 2]. Ибупрофен в форме таблеток широко представлен продукцией различных производителей. По мере совершенствования технологии меняется как производство, так и методы качественного и количественного анализа вещества в конечном продукте.

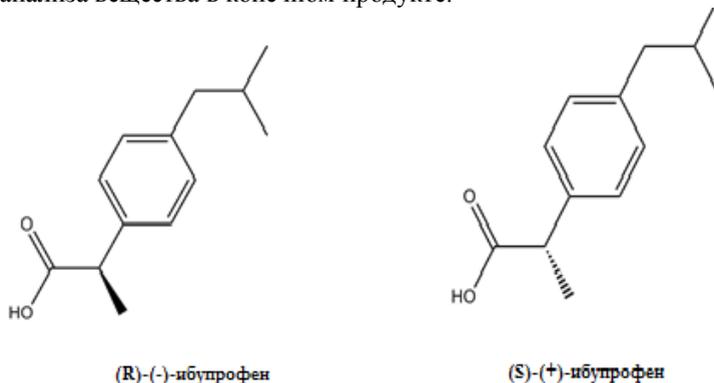


Рис. 1. Оптические изомеры ибупрофена

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

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

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

Таблица 1. Объекты исследования

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

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

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

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

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

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

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

Полагают, что сначала измеряют оптическую плотность раствора феррицианида калия (далее соль) определенной концентрации, а затем приготовленного раствора. Исходят из условия, что стандартная концентрация соли (из навески 0,06 г с последующим определенным разведением) и стандартная концентрация ибупрофена (из навески 0,05 г с последующим определенным разведением) дают на 259 нм с раство-

ром сравнения щелочи 0,1 М одинаковую оптическую плотность. Поэтому соотношение для стандартов стремится к единице, а для производных растворов зависит от количества ибупрофена в «пробе» (точнее от массовой доли w , которую можно перевести в %).

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

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

где индекс «0» относится к феррицианиду калия, «x» к ибупрофену. Тогда соотношение приобретает вид:

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

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

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

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

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

В ходе исследования рацемата ибупрофена методом поляриметрии субстанции (образец № 1), таблеток (образцы 2, 4) и S (+)-энантиомера ибупрофена, дексипрофена (образец № 3) было установлено, что отклонение во всех случаях не превышает 5%.

В результате проведенных испытаний было обнаружено, что оптический угол субстанций ибупрофена (образец № 1), таблеток (образцы № 2, 4) равен или очень близок к нулю.

Таблица 3. Результаты исследования угла оптического вращения образцов

Образцы	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Образец № 4
α , град.	0	0	+3,5	

Данные эксперимента подтверждают присутствие рацемата ибупрофена и отсутствие оптически активных веществ во вспомогательных веществах в образцах № 1, 2, 4. Угол оптического вращения образца № 3 составил +3,5.

Таким образом, количественный анализ дексипрофена в таблетках можно проводить по методикам, разработанным для рацемата (ибупрофена). Результаты исследования угла оптического вращения образцов показали его наличие только в образце № 3, что связано с наличием S-(+)-ибупрофена, обладающего оптической активностью.

Список литературы

1. Ayres J.G., Fleming D., Whittington R. Ibuprofen. The American Society of Health-System Pharmacists // *The Lancet*. Elsevier, 1987. 9 May. Vol. 1. No 8541). P. 1082. doi:10.1016/S0140-6736(87)90499-5. PMID 2883408.
2. Бушра Р. Обзор клинической фармакологии ибупрофена. Аслам-Н. // *Oman Medical Journal*. 2010. Jul. № 5(3). P. 155–1661. DOI: 10.5001/omj.2010.49.
3. Василенко И.А., Лебедева М.В., Листров В.А. Оптические изомеры в фармацевтике // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015. № 1(10). С. 92–104.
4. Артасюк Е.М., Илларионова Е.А., Сыроватский И.П. Способ определения ибупрофена // *Медицинский вестник Башкортостана*. 2006. № 1. С. 187–189.
5. Герасимчук Т.В. Спектрофотометрическое определение ибупрофена в таблеточной массе и таблетках, покрытых оболочкой. Научные труды, «Современные методы анализа фармацевтических препаратов». Т. XXVI. Москва. 1988. С. 39–42.
6. ФС 42-2823-92 «Ибупрофен», С. 3.
7. Патент RU2333490C2 Способ количественного определения ибупрофена. 01.09.2006.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ

УДК 577.1:616-056

Ali Adeeb Hussein Ali

*Position: Postgraduate student of the Department of Biochemistry of
Yanka Kupala State University of Grodno,
Grodno, Belarus*

E-mail: medic_lab2015@yahoo.com

DYSLIPIDEMIA IN OVERWEIGHT

*In 2016, the World Health Organization (WHO) reported that 13% of individuals worldwide were obese and that 39% of people were overweight. **The work's goal** is to estimate lipid metabolic disorders in overweight people. In our study, for the first time, we present the results of a study of carbohydrate and fat metabolism in overweight subjects with a BMI of 25-29.9 males and females in Grodno region in the Republic of Belarus.*

Keywords: *obesity, body mass index, glucose, cholesterol, triglycerides.*

Али Адиб Хуссейн Али

*Гродненского государственного университета им. Я. Купалы,
Гродно, Республика Беларусь*

E-mail: medic_lab2015@yahoo.com

ДИСЛИПИДЕМИЯ ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ ВЕСЕ

В 2016 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сообщила, что 13% людей во всем мире страдают ожирением, а 39% людей имеют избыточный вес. Цель работы — оценить нарушения липидного обмена у людей с избыточной массой тела. В нашем исследовании впервые представлены результаты изучения углеводного и жирового обмена у лиц с избыточной массой тела с ИМТ 25-29,9 у мужчин и женщин в Гродненской области Республики Беларусь.

Ключевые слова: *ожирение, индекс массы тела, глюкоза, холестерин, триглицериды.*

Introduction. Overweight is common disorder in the world. It is characterized by an increase in fat mass, which is a major factor in increasing mor-

tality from cardiovascular diseases [1]. Due to their rising trends in both developed and emerging nations, general and abdominal obesity are both global health concerns. In 2016, the World Health Organization (WHO) reported that 13% of individuals worldwide were obese and that 39% of people were overweight [2]. Body Mass Index (BMI), which is equal to weight in kilograms divided by height in meters squared, is the most often used method to assess obesity and overweight.

It is necessary in both theory and practice to study lipid metabolism markers and identify the prevalence and patterns of their problems. One of the body's most complex exchanges is lipid metabolism. Lipids play a significant role in many bodily processes, including digestion, blood clotting, and the formation of enzyme reactions. They also form the lipid matrix of cell membranes and cell organelles, support the structure of the central nervous system, participate in plastic and energy metabolism, adaptive and immunological reactions, and energy metabolism hormones [3] [4]. Biochemical markers of abnormalities in lipid metabolism and the development of atherogenic processes in the human body include hyperlipidemia and dyslipidemia. Low-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and high-density lipoprotein cholesterol levels rise along with total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and triglycerides, while HDL-C levels fall as a result of impaired lipoprotein synthesis, transport, and breakdown. Lipoproteins are the transport forms of blood lipids and excessively.

Preadipocytes (adipoblasts), adipocytes, macrophages, fibroblasts, and other cell types are present in adipose tissue [5]. The second type of cell is derived from pluripotent mesoderm stem cells. In the adult human organism, new differentiated ("little") adipocytes are produced from preadipocytes [5]. Because of the rise in dietary fatty acid consumption, these adipocytes have become larger. Long-chain fatty acids are taken up by adipocytes from the bloodstream and stored as neutral triacylglycerols.

The work's goal is to estimate lipid metabolic disorders in overweight people.

Materials and methods. The study included 100 males and females without clinical complaints, without obesity. The mean age was 25.5 ± 0.52 years for males and 24.3 ± 0.24 years for females. The methods of examination included the collection of anamnesis; measurement of anthropometric indicators. To study carbohydrate metabolism, the concentrations of venous blood glucose were measured on an empty stomach .

The results were evaluated according to WHO criteria: fasting glucose values up to 6.1 mmol/l were considered normal. Lipid metabolism was assessed according to the recommendations of the Adult Treatment Panel III. Triglyceride levels less than 1,7 mmol/l, total cholesterol levels less than

5.17 mmol/l, and HDL cholesterol levels greater than 1.0 mmol/l are all acceptable. The determination of the spectrum of biochemical parameters in the blood (glucose, cholesterol, HDL, LDL, triglycerides) was carried out using the BS-330 analyzer (Mindray, China) and reagents manufactured by Diasense (Belarus).

The processing of the obtained results was carried out using the standard statistical software package «SPSS 26». Scores were described in terms of the mean and standard error of the mean ($M \pm m$). When comparing the mean values in the various groups studied, the analysis of variance and t-test were used. The results were considered significant at a probability level of $p < 0.05$.

Discussion and results. To reduce the prevalence of early obesity, indicators based on determination of plasma glucose concentrations, total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein cholesterol, and high-density lipoprotein cholesterol have been proposed as criteria. At present, recommendations for the diagnosis and correction of lipid metabolic disorders and prevention and treatment of atherosclerosis in the Russian Federation HLSC provide for adult-only activities. As a result, there are no standards for teenage people who need preventive and therapeutic recommendations in the Russian Federation.

Table 1. Biochemical parameters of blood serum in females with different BMI values

Indicator	Females		P
	BMI 18–24.9	BMI 25–29.9	
Glucose	4.48±0.11	5.29±0.21	=0.001
Cholesterol	4.18±0.3	6.38±0.23	=0.001
Cholesterol-HDL	0.59±0.19	0.78±0.21	=0.50
Cholesterol-LDL	2.99±0.49	3.69±0.45	=0.29
Triglycerides	1.43±0.16	1.91±0.18	=0.01

According to the results of the study of sugar and lipid profile shown in Table 1 for female patients over 18 years of age with a BMI of 25–29.9, the glucose concentration increased with an increase in BMI (overweight) at a significance level of $p=0.001$ and increased cholesterol in comparison with the control group at the significance level of $p=0.001$ and triglycerides increased with the increase in body mass index (weight gain) at the significance level of $p=0.01$. It should be noted that the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and the low-density lipoprotein (LDL) cholesterol in females did not have noticeable changes, although there was a tendency to increase them with increasing body mass index.

Table 2. Biochemical parameters of blood serum in males with different BMI values

Indicator	Male		p
	BMI 18-24.9	BMI 25-29.9	
Glucose	4.63±0.13	5.79±0.18	0.004
Cholesterol	4.22±0.28	6.62±0.64	0.001
Cholesterol-HDL	0.42±0.14	0.62±0.12	0.28
Cholesterol-LDL	2.09±0.34	4.04±0.53	0.003
Triglycerides	1.22±0.28	2.07±0.48	0.01

According to the results of the study of sugar and lipid profile shown in Table 2 for male patients over 18 years of age with a BMI of 25–29.9, the glucose concentration increased with an increase in BMI (overweight) in the group of men at a significance level of $p=0.004$ and increased Cholesterol in comparison with the control group at the significance level of $p=0.001$ and triglycerides increased with the increase in body mass index (weight gain) at the significance level of $p=0.01$. LDL cholesterol levels increased significantly in the male half of patients with a BMI of 25 to 29.9, to 1.67 mmol/L, compared to 1.22 mmol/L in patients with a BMI of 18-24.9 ($p=0.003$).

Conclusion. In our study, for the first time, we present the results of a study of carbohydrate and fat metabolism in overweight subjects with a BMI of 25–29.9 males and females in Grodno region in the Republic of Belarus.

In the females group with BMI 25–29.9, a slight increase in sugar concentration was observed compared to the control group with BMI 18–24.9, where the increase compared to the control group was 18%. The percentage of increase in cholesterol, triglycerides and harmful fats (LDL-C) compared to the control group (54.3%, 33.5%, 23.4%) respectively, which confirms the risk of developing obesity in the future in adults.

In the males group with BMI 25–29.9, increase in sugar concentration was observed compared to the control group with BMI 18–24.9, where the increase compared to the control group was 25%, which draws attention to the monitoring of carbohydrate metabolism profile. The percentage of increase in cholesterol, triglycerides and LDL-C compared to the control group (58.4%, 69.6%, 93.3%) respectively, which confirms the risk of developing obesity in the future in adults.

It should be noted that in the group of overweight males, the percentage of increase in the concentrations of sugar, cholesterol, triglycerides and harmful fats was more than that of the female group when comparing each group with its control group. It is a very high risk of developing obesity,

especially as well as developing cardiovascular disease and diabetes in the future, and it allows us to suspect the genetic form of hyperlipidemia. These patients, in accordance with recommendations (EOC/EO 2016), should receive lipid-lowering therapy from the moment of discovery.

References

1. Payab M. et al. Effect of the herbal medicines in obesity and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of clinical trials / Payab M et al. // *Phyther. Res.* Wiley Online Library, 2020. Vol. 34. № 3. P. 526–545.
2. Liorens S. Pathogenic Microenvironment from Diabetic–Obese Visceral and Subcutaneous Adipocytes Activating Differentiation of Human Healthy Preadipocytes Increases Intracellular Fat, Effect of the Apocarotenoid Crocetin // *Nutrients.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2021. Vol. 13. № 3. P. 1032.
3. Romantsova T.I. The Obesity Epidemic: Obvious and Probable Causes. // *Obesity and metabolism.* 2011. Т. 8. № 1. P. 5–19 (In Russian).
4. Weltman A., Despres J.P., Clasey J.L. et al. Impact of abdominal visceral fat, growth hormone, fitness, and insulin on lipids and lipoproteins in older adults // *Metabolism.* 2003. V. 52. P. 73–80.
5. Otto T.C., Lane M.D. Adipose development: from stem cell to adipocyte // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* Taylor & Francis. 2005. Vol. 40. № 4. P. 229–242.
6. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of WHO Consultation. 1999. Part 1. WHO/NCD/NCS. P. 32–52.

УДК 577.17

Бахтукоев А.А., Деркач К.В., Лебедев И.А., Шпаков А.О.
*ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова» Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия
bahtyukov@gmail.com*

АНОРЕКСИГЕННЫЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ФРАГМЕНТА ЛЕПТИНА ПРИ КУРСОВОМ ЛЕЧЕНИИ КРЫС С ДИЕТА- ИНДУЦИРОВАННЫМ ОЖИРЕНИЕМ

*Модифицированный миристамом с N-конца фрагмент лептина
116–122 при интраназальном его введении крысам с диета-
индуцированным ожирением в суточной дозе 100 мкг/крысу ослабляет*

гиперфагию, снижает массу тела и жировой ткани, частично восстанавливает повышенные при ожирении уровни глюкозы, инсулина, лептина, улучшает чувствительность к инсулину.

Ключевые слова: лептин, пептидный фрагмент, интраназальное введение, ожирение, гиперлептинемия, гипергликемия.

Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Lebedev I.A., Shpakov A.O.
*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

ANOREXIGENIC AND METABOLIC EFFECTS OF INTRANASALLY INTRODUCED LEPTIN FRAGMENT DURING COURSE TREATMENT OF RATS WITH DIET-INDUCED OBESITY

Anorexigenic and metabolic effects of intranasally administered leptin fragment in treatment of rats with diet-induced obesity.

The leptin fragment 116–122 modified with myristate from the N-terminus, when intranasally administered to rats with diet-induced obesity at a daily dose of 100 µg/rat, weakens hyperphagia, reduces the body and fat weight, partially restores the glucose, insulin and leptin levels, which are increased in obesity, and improves the insulin sensitivity.

Keywords: *leptin, peptide fragment, intranasal administration, obesity, hyperleptinemia, hyperglycemia.*

Введение. Адипокин лептин, продуцируемый адипоцитами белой жировой ткани, является важнейшим регулятором пищевого поведения, массы тела, метаболических и гормональных показателей [1]. Большинство своих эффектов он осуществляет через активацию лептиновых рецепторов в гипоталамических нейронах. В условиях ожирения и ассоциированных с ним метаболических заболеваний уровень лептина в крови повышается, что характеризуется как гиперлептинемия, и это приводит к лептиновой резистентности [1]. Однако такая ситуация характерна в основном для периферических тканей, поскольку в ЦНС и, в первую очередь, в гипоталамусе отмечается недостаточность лептина. Этот парадоксальный факт объясняется нарушением транспорта лептина через гематоэнцефалический барьер. Транспорт лептина в мозг осуществляется с помощью рецептор-опосредуемого механизма, который в условиях лептиновой резистентности ослабевает [2]. В результате уровень лептина в мозге при метаболических расстройствах снижается, как показано ранее нами [3], вследствие чего

необходимы подходы, направленные на повышение уровня лептина в мозге. Наиболее подходящим для этого является интраназальный способ введения лептина [4, 5], но его недостатками являются высокая стоимость и низкая стабильность препаратов лептина, а также быстрое развитие центральной лептиновой резистентности при накоплении лептина в ЦНС. Альтернативой может стать применение укороченных пептидных аналогов лептина, которые включают его функционально активные последовательности, взаимодействующие с лептиновым рецептором и запускающие целевые сигнальные каскады. Среди них фрагмент лептина 116–122 [6, 7]. Поскольку значительный пул лептиновых рецепторов локализован внутри клеток, то для придания пептиду способности проникать через мембрану N-конец пептида модифицируется миристатином. Цель работы состояла в изучении влияния интраназально вводимого миристоилированного пептида 116–122 крысам с диета-индуцированным ожирением (ДИО) на их пищевое поведение, массу тела и жировой ткани, показатели липидограммы, уровни глюкозы, инсулина и лептина, толерантность к глюкозе.

Материал и методы. Пептид 116–122 синтезировали с помощью ВОС/Vzl-стратегии и *Na-трет*-бутилоксикарбонильных производных аминокислот. Для миристоилирования N-концевого остатка серина пептид обрабатывали активированным эфиром миристиновой кислоты. Структуру подтверждали с помощью масс-спектрометрии, которая показала значение массы для целевого соединения 943.5412 (масса ионов $M+Na^+=966.5273$ и $M+K^+=982.5024$).

Для биологических экспериментов использовали крыс Wistar. Их содержали в стандартных условиях вивария, все процедуры по уходу за животными и по их использованию для моделирования ожирения и оценки эффектов фрагмента лептина осуществляли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

ДИО индуцировали, переводя крыс в двухмесячном возрасте на высокожировую диету, состав которой приведен нами ранее [8]. Контрольные животные потребляли стандартный сухой корм. Через 16 недель содержания на высокожировой диете отбирали крыс с повышенной массой тела (на 10% выше контроля), гипергликемией (через 2 ч после приема пищи на 30% выше контроля) и нарушенной глюкозотолерантностью, которую оценивали в интраперитонеальном глюкозотолерантном тесте (ИГТТ). Для этого крысам вводили раствор глюкозы (2 г/кг) и измеряли ее уровень в крови до и через 15, 30, 60 и 120 мин после инъекции. Кровь забирали из хвостовой вены под местной

анестезией (лидокаин, 3 мг/кг). Уровень глюкозы измеряли с помощью тест-полосок «One Touch Ultra» (США) и глюкометра «Life Scan Johnson & Johnson» (Дания). Формировали 3 группы (по 6 животных) — контроль (К), ожирение (ОЖ) и ожирение с обработкой в течение 9 дней фрагментом лептина (интраназально, в суточной дозе 100 мкг/крысу) (ОЖ+П). Группы К и ОЖ вместо пептида получали физиологический раствор. В течение эксперимента крыс переводили на стандартный корм. В конце эксперимента проводили ИГТТ и оценивали концентрацию глюкозы, лептина и инсулина в крови до и через 120 мин после глюкозной нагрузки. Концентрацию гормонов измеряли с помощью наборов «Rat Insulin ELISA» («Mercodia AB», Швеция) и «ELISA for Leptin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США). Затем животных наркотизировали (хлоральгидрат, 400 мг/кг, в/б), декапитировали, измеряли массу жира, оценивали уровни триглицеридов и общего холестерина с помощью тест-полосок «Triglycerides multiCare-in» и «Cholesterol multiCare-in» («Biochemical Systems Int.», Италия).

Статистический анализ осуществляли, используя программу «Microsoft Office Excel 2007» (США). Результаты представляли, как $M \pm SEM$. Нормальность распределения оценивали, используя критерий Шапиро-Уилка. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Крысы с ожирением имели повышенные массу тела и жировой ткани и долю жировой ткани, гипергликемию, нарушенную толерантность к глюкозе, оцениваемую по более высокому ходу глюкозной кривой в ИГТТ, повышенные уровни триглицеридов, общего холестерина, инсулина и лептина (как натощак, так и через 120 мин после глюкозной нагрузки), а также повышенный индекс инсулинорезистентности (ИР) (см. табл. 1, рис. 1). В группе ОЖ отмечали повышенное потребление пищи, оцениваемое по калорийности (см. табл. 1). Эти данные указывают на типичные признаки метаболического синдрома с характерными для него гипергликемией, нарушенной толерантностью к глюкозе, гиперинсулинемией, гиперлептинемией и дислипидемией.

Десятидневная обработка животных с ожирением с помощью фрагмента лептина значимо снижала массу тела и жировой ткани, а также соотношение массы жира к общей массе тела, и это было ассоциировано с ослаблением аппетита (см. табл. 1). Уровень глюкозы натощак оставался выше, чем в контроле и не отличался от группы ОЖ, в то время как уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки был ниже, чем в группе ОЖ, что в совокупности с данными об улучшении толерантности к глюкозе (более низкий ход глюкозной кривой в ИГТТ) указывает на умеренно выраженное улучшение глюкозного гомеостаза (см. табл. 1, рис. 1).

В группе ОЖ+П в сравнении с группой ОЖ снижались базовые и стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина и индекс ИР, что свидетельствует об улучшении системной чувствительности тканей к инсулину и лептину (см. табл. 1). В меньшей степени пептидный фрагмент влиял на показатели липидного обмена — отмечалась тенденция к снижению уровней триглицеридов и общего холестерина в крови, но различия с группой ОЖ не были значимыми (см. табл. 1).

Таким образом, миристоилированный фрагмент лептина 116–122 ослабляет гиперфагию у крыс с ожирением, что приводит к снижению массы тела и жировой ткани и, как следствие, улучшает чувствительность к лептину и инсулину и частично восстанавливает глюкозный и липидный метаболизм. В этом отношении фрагмент лептина ведет себя подобно полноразмерному гормону, введение которого в ЦНС, интраназально или интрацеребрально, приводит к улучшению метаболических показателей у животных с ожирением [4, 5, 9, 10]. Полученные данные указывают на то, что функционально активные фрагменты лептина могут быть использованы для разработки фармакологических препаратов, направленных на улучшение метаболических и гормональных показателей при ожирении и ассоциированных с ним метаболических расстройств, которые характеризуются ослаблением центральной лептиновой сигнализации.

Работа поддержана Российским научным фондом (№ 22-75-00130).

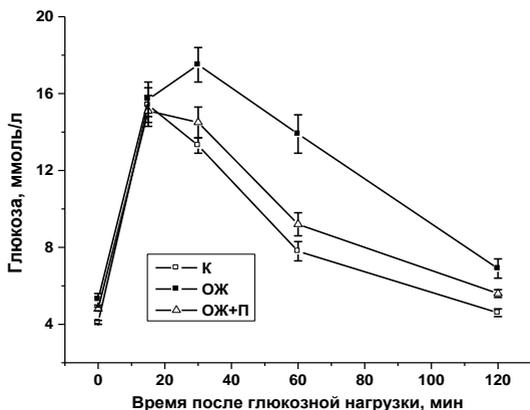


Рис. 1. Глюкозные концентрационные кривые в ИГТТ у крыс с ожирением и после их обработки фрагментом лептина 116–122

Таблица 1. Масса тела и жира, доля жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина и индекс ИР до и через 120 мин после глюкозной нагрузки у ДИО-крыс и влияние на них обработки фрагментом лептина 116–122

Показатель	К	ОЖ	ОЖ+П
Масса тела, г	363,0±6,4	413,3±6,9 ^a	381,7±7,1 ^b
Масса АЖ, г	4,8±0,1	11,5±0,8 ^a	7,9±0,8 ^{a,b}
Масса ЭЖ, г	3,6±0,2	6,6±0,5 ^a	5,1±0,4 ^{a,b}
Доля жира, %	2,3±0,1	4,4±0,2 ^a	3,4±0,3 ^{a,b}
Потребление корма, ккал/крысу/день	19,8±0,4	24,6±0,7 ^a	20,9±1,1 ^b
Глюкоза-0, мМ	4,1±0,1	5,3±0,3 ^a	4,8±0,2 ^a
Глюкоза-120, мМ	4,6±0,2 ^c	6,9±0,5 ^{a,c}	5,6±0,2 ^{a,b,c}
Инсулин-0, нг/мл	0,67±0,08	1,36±0,09 ^a	0,76±0,08 ^b
Инсулин-120, нг/мл	0,83±0,11	1,93±0,20 ^{a,c}	1,01±0,15 ^b
Индекс ИР-0, отн.ед.	2,70±0,30	7,23±0,80 ^a	3,61±0,41 ^b
Индекс ИР-120, отн.ед.	3,71±0,38	13,53±1,95 ^{a,c}	5,57±0,77 ^b
Лептин-0, нг/мл	1,05±0,17	3,16±0,23 ^a	2,06±0,20 ^{a,b}
Лептин-120, нг/мл	1,38±0,21	6,06±0,73 ^{a,c}	2,93±0,32 ^{a,b,c}
Триглицериды, мМ	2,03±0,10	3,25±0,20 ^a	2,68±0,25 ^a
ОХ, мМ	3,92±0,15	5,03±0,27 ^a	4,43±0,28

Примечание. АЖ — абдоминальный жир, ЭЖ — эпидидимальный жир, ОХ — общий холестерин. Значения представлены, как $M \pm SEM$. Различия с группой К (^a) и между группами ОЖ и ОЖ+П (^b) статистически значимы при $p < 0,05$. Различия между показателем до и через 120 мин после глюкозной нагрузки (^c) статистически значимы при $p < 0,05$.

Данные представлены как $M \pm SEM$, $n=6$ в каждой экспериментальной группе.

Список литературы

1. Misch M., Puthanveetil P. The Head-to-Toe Hormone: Leptin as an Extensive Modulator of Physiologic Systems // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23. № 10. P. 5439.

2. Banks W.A., DiPalma C.R., Farrell C.L. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity☆ // *Peptides* (N.Y.). 1999. Vol. 20. № 11. P. 1341–1345.
3. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect // *PLoS One*. 2019. Vol. 14. № 3. P. 213–779.
4. Schulz C., Paulus K., Jöhren O., Lehnert H. Intranasal Leptin Reduces Appetite and Induces Weight Loss in Rats with Diet-Induced Obesity (DIO) // *Endocrinology*. 2012. Vol. 153. № 1. P. 143–153.
5. Berger S., Pho H., Fleury-Curado T., Bevans-Fonti S., Younas H., Shin M.K., Jun J.C., Anokye-Danso F., Ahima R.S., Enquist L.W., Mendelowitz D., Schwartz A.R., Polotsky V.Y. Intranasal Leptin Relieves Sleep-disordered Breathing in Mice with Diet-induced Obesity // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019. Vol. 199. № 6. P. 773–783.
6. Novakovic Z.M., Anderson B.M., Grasso P. Myristic acid conjugation of [D-Leu-4]-OB3, a biologically active leptin-related synthetic peptide amide, significantly improves its pharmacokinetic profile and efficacy // *Peptides* (N.Y.). 2014. Vol. 62. P. 176–182.
7. Wang A., Anderson B.M., Novakovic Z.M., Grasso P. [D-Leu-4]-OB3 and MA-[D-Leu-4]-OB3, small molecule synthetic peptide leptin mimetics, improve glycemic control in diet-induced obese (DIO) mice // *Peptides* (N.Y.). 2018. Vol. 101. P. 51–59.
8. Derkach K.V., Bondareva V.M., Chistyakova O.V., Berstein L.M., Shpakov A.O. The Effect of Long-Term Intranasal Serotonin Treatment on Metabolic Parameters and Hormonal Signaling in Rats with High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes // *International Journal Endocrinology*. 2015. Vol. 2015. P. 1–17.
9. Bermúdez-Humarán L.G., Nouaille S., Zilberfarb V., Corthier G., Gruss A., Langella P., Issad T. Effects of Intranasal Administration of a Leptin-Secreting *Lactococcus lactis* Recombinant on Food Intake, Body Weight, and Immune Response of Mice // *Appl Environ Microbiology*. 2007. Vol. 73. № 16. P. 5300–5307.
10. Minciu Macrea M., Misra H., Zagrean L. The neuroprotective effect of intranasally applied leptin against hypoxic neuronal injury // *Medical Hypotheses*. 2010. Vol. 74. № 6. P. 1036–1037.

УДК 577.17

**Бахтыков А.А.,¹ Деркач К.В.,¹ Сорокоумов В.Н.,² Лебедев И.А.,¹
Фокина Е.А.,¹ Шпаков А.О.¹**

¹ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова» Российской академии наук,
abakhtyukov@yandex.ru;

²Институт химии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет»
Санкт-Петербург, Россия

СТЕРОИДОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ГОНАДОТРОПИНА И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА У САМЦОВ КРЫС С ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

При совместном введении соединения ТПОЗ, низкомолекулярного аллостерического агониста рецептора лютеинизирующего гормона, и хорионического гонадотропина человека здоровым самцам крыс и животным со стрептозотоциновым диабетом отмечали усиление их стероидогенного эффекта, что указывает на частичную аддитивность стимулирующего воздействия ТПОЗ и гонадотропина на рецептор лютеинизирующего гормона и его каскады.

Ключевые слова: лютеинизирующий гормон, хорионический гонадотропин, аллостерический агонист, тестостерон, диабет.

**Bakhtyukov A.A.,¹ Derkach K.V.,¹ Sorokoumov V.N.,²
Lebedev I.A.,¹ Fokina E.A.,¹ Shpakov A.O.¹**

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia; abakhtyukov@yandex.ru;

²Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, Russia

STEROIDOGENIC EFFECT OF GONADOTROPIN AND A LOW- MOLECULAR LUTHEINIZING HORMONE RECEPTOR AGONIST IN MALE RATS WITH TYPE 1 DIABETES

When TP03, a low-molecular-weight allosteric agonist of luteinizing hormone receptor, and human chorionic gonadotropin were co-administered to healthy male rats and animals with streptozotocin diabetes, an increase in their steroidogenic effect was observed, which indicates a partial additivity of the stimulating effect of TP03 and gonadotropin on the luteinizing hormone receptor and its cascades.

Keywords: *luteinizing hormone, human chorionic gonadotropin, allosteric agonist, testosterone, diabetes.*

Введение. Проблема восстановления андрогенного дефицита у мужчин при сахарном диабете 1-го типа (СД1) и при других эндокринных расстройствах стоит достаточно остро, поскольку снижение продукции андрогенов не только снижает либидо и может стать причиной бесплодия, но и способствует метаболическим и эндокринным нарушениям и повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Заместительная терапия тестостероном и его аналогами при длительном применении вызывает ослабление гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и характеризуется риском развития онкологических заболеваний. Применение гонадотропинов, в первую очередь хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), быстро приводит к резистентности к ним тканей-мишеней и характеризуется рядом других побочных эффектов, которые особенно отчетливо проявляются при использовании гонадотропинов в субмаксимальных дозах [1, 2].

Альтернативой гонадотропинам являются синтетические низкомолекулярные соединения, которые могут эффективно взаимодействовать с аллостерическим сайтом, расположенным в трансмембранном канале рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР). Нами ранее были разработаны тиенопиримидиновые производные с активностью ЛГР-агонистов, в том числе наиболее активное из них соединение ТПОЗ, которые стимулировали тестикулярный стероидогенез как у здоровых, так и у диабетических крыс [3, 4]. Перспективным может оказаться и совместное применение гонадотропинов и низкомолекулярных ЛГР-агонистов. Они взаимодействуют с разными сайтами рецептора и потому не конкурируют между собой [5, 6], вследствие чего их стероидогенные эффекты могут быть, по крайней мере, частично аддитивными. Цель исследования состояла в сравнительном изучении влияния раздельного и совместного введения ХГЧ и ТПОЗ на уровни тестостерона в крови здоровых самцов крыс и животным со стрептозоциновой моделью СД1.

Материал и методы. В опытах использовали самцов крыс Wistar, которых содержали в стандартных условиях вивария. Все процедуры с животными осуществляли, следуя требованиям Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

СД1 индуцировали однократной обработкой самцов крыс Wistar с помощью стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг (в/б). Контрольные животные получали инъекцию 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5), раствори-

теля стрептозотоцина. Эффективность развития СД1 оценивали через 10 дней по уровню глюкозы в крови через 2 ч после потребления стандартной кормовой смеси, отбирая животных с уровнем глюкозы выше 15 мМ. Для определения уровня глюкозы использовали глюкометр и тест-полоски «One-Touch Select Ultra» («Life Scan», США). Через 30 дней после обработки стрептозотоцином крыс, удовлетворявших критериям СД1, случайным образом распределяли на группы (в каждой $n=5$): контрольные животные («К»), диабет без обработки («СД»), диабет с однократной обработкой ТП03 (в/б) в дозе 15 мг/кг («СД+ТП-1д») или ХГЧ (п/к) в дозе 10 МЕ/крысу («СД+ХГЧ-1д»), диабет с трехдневной обработкой ТП03 (в/б) в суточной дозе 15 мг/кг («СД+ТП-3д»), диабет с трехдневной обработкой ТП03 (в/б) в суточной дозе 15 мг/кг и на третий день с инъекцией ХГЧ (п/к) в дозе 10 МЕ/крысу («СД+ТП03-3д+ХГЧ»). По такому же принципу формировали группы здоровых животных: интактный контроль («К»), контроль с однократной обработкой ТП03 (15 мг/кг) («К+ТП-1д») или ХГЧ (10 МЕ/крысу) («К+ХГЧ-1д»), контроль с трехдневной обработкой ТП03 (15 мг/кг/сутки) («К+ТП-3д»), контроль с трехдневной обработкой ТП03 (15 мг/кг/сутки) и затем однократно ХГЧ (10 МЕ/крысу) («К+ТП03-3д+ХГЧ»). ХГЧ в группах «СД+ТП03-3д+ХГЧ» и «К+ТП03-3д+ХГЧ» вводили через 30 мин после инъекции ТП03. Уровень тестостерона оценивали до введения препаратов (нулевая точка) и через 2 и 3.5 ч после введения ТП03 или через 1,5 и 3 ч после введения ХГЧ. Кровь для оценки уровня тестостерона забирали из хвостовой вены под местным лидокаиновым наркозом, и затем концентрацию гормона определяли с помощью ИФА-набора «Тестостерон-ИФА» («Алкор-Био», Россия). ТП03 был синтезирован, как описано ранее [4].

Статистический анализ проводили с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007» (США), результаты представляли в виде $M \pm SEM$. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Однократное введение ТП03 и ХГЧ приводило к повышению уровня тестостерона, причем их эффекты были сопоставимыми. Трехдневное введение ТП03 не приводило к заметному усилению стероидогенного эффекта, причем существенно менялась динамика повышения уровня гормона — уже через 2 ч его уровень достигал максимума (табл. 1).

Эти данные согласуются с нашими ранними результатами о том, что при продолжительном введении тиенопиримидиновых производных их стероидогенный эффект, в отличие от длительно вводимого ХГЧ, не ослабляется, а, напротив, имеет тенденцию к усилению и бо-

лее быстро достигает максимальных значений [3, 4]. В группе «К+ТП03-3д+ХГЧ» отмечали значительное повышение уровня тестостерона в сравнении с группами с монотерапией низкомолекулярным агонистом («К+ТП03-1д», «К+ТП03-3д») или ХГЧ («К+ХГЧ-1д»), что может свидетельствовать о частичной аддитивности стероидогенных эффектов ТП03 и ХГЧ (табл. 1).

Таблица 1. Влияние раздельного и совместного введения ТП03 и ХГЧ здоровым крысам на уровень тестостерона в крови животных

Показатель	0	2 ч	3,5 ч
«К»	7,8±1,1	9,1±1,7	7,8±1,3
«К+ТП03-1д»	8,3±0,7	21,7±3,7 ^{а,b,c}	30,0±2,7 ^{а,b,c}
«К+ХГЧ-1д»	8,2±0,7	24,4±1,0 ^{а,b,c}	39,4±2,4 ^{а,b,c}
«К+ТП03-3д»	7,6±1,8	31,5±4,1 ^{а,b,c}	32,5±5,7 ^{а,b,c}
«К+ТП03-3д+ХГЧ»	8,4±1,1	43,2±2,8 ^{а,c}	55,3±3,4 ^{а,c}

Примечание. Различия значимы при $p < 0.05$: ^а с группой «К», ^б с группой «К+ТП03-3д+ХГЧ», ^с с нулевой точкой. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n=5$ в каждой экспериментальной группе.

Диабетические крысы имели сниженный уровень тестостерона на всем протяжении эксперимента (табл. 2), что указывает на развитие у них андрогенного дефицита и характерно для тяжелых форм СД1 [7]. Стероидогенные эффекты ТП03 и ХГЧ были в небольшой степени снижены в сравнении с таковыми у здоровых животных, что указывает на функциональные нарушения в компонентах регулируемой гонадотропинами сигнальной системы в клетках Лейдига семенников и(или) в компонентах системы тестикулярного стероидогенеза [8, 9]. При этом, однако, при совместном применении ТП03 и ХГЧ их эффект в значительной степени усиливался, в той же степени, что у здоровых животных (табл. 2).

Таблица 2. Влияние раздельного и совместного введения ТП03 и ХГЧ диабетическим крысам на уровень тестостерона в крови животных

Показатель	0	2 ч	3,5 ч
«К»	8,8±0,9	9,5±1,5	8,4±1,1
«СД»	4,9±0,4*	5,0±0,8	4,6±1,0

«СД+ТП03-1д»	5,9±0,6*	15,3±3,5 ^{a,b,c}	20,6±2,8 ^{a,b,c}
«СД+ХГЧ-1д»	5,2±0,8*	16,5±1,4 ^{a,b,c}	36,1±3,2 ^{a,b,c}
«СД+ТП03-3д»	6,2±0,9	18,1±3,4 ^{a,b,c}	21,4±4,5 ^{a,b,c}
«СД+ТП03-3д+ХГЧ»	4,9±0,4*	35,1±4,1 ^{a,c}	53,1±6,5 ^{a,c}

Примечание. Различия значимы при $p < 0.05$: ^a с группой «СД», ^b с группой «СД+ТП03-3д+ХГЧ», ^c с нулевой точкой, * с группой «К» в нулевой точке. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n=5$ в каждой экспериментальной группе

Таким образом, нами впервые получены доказательства того, что при совместном введении сравнительно низких доз ТП03 и ХГЧ самцам крыс их стероидогенные эффекты превосходят таковые, полученные в условиях монотерапии, что указывает на их частичную аддитивность. При этом эффект аддитивности был выражен и у диабетических животных, несмотря на характерные для них функциональные и морфологические изменения в семенниках. Это, как мы полагаем, объясняется присущими аллостерическим агонистам ЛГР свойствами шаперонов, восстанавливающих посттрансляционный процессинг молекулы ЛГР, нарушенный при диабетической патологии. Ранее свойства низкомолекулярного шаперона были продемонстрированы для другого аллостерического агониста — соединения Org43553, функционального гомолога ТП03 [10].

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 19-75-20122).

Список литературы

1. Casarini L., Santi D., Brigante G., Simoni M. Two Hormones for One Receptor: Evolution, Biochemistry, Actions, and Pathophysiology of LH and hCG // *Endocrine Reviews*. 2018. Vol. 39. № 5. P. 549–592.
2. Шапов А.О. Гонадотропины — от теории к клинической практике. СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2018. 347 с.
3. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Gureev M.A., Dar'in D.V., Sorokoumov V.N., Romanova I.V., Morina I.Y., Stepochkina A.M., Shpakov A.O. Comparative Study of the Steroidogenic Effects of Human Chorionic Gonadotropin and Thieno[2,3-D]pyrimidine-Based Allosteric Agonist of Luteinizing Hormone Receptor in Young Adult, Aging and Diabetic Male Rats // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. № 20. P. 7493.
4. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Sorokoumov V.N., Stepochkina A.M., Romanova I.V., Morina I.Y., Zakharova I.O.,

Bayunova L.V., Shpakov A.O. The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 23. № 1. P. 198.

5. Van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M.J., Hanssen R.G. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2008. Vol. 378. № 5. P. 503–514.

6. Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S. Discovery and Development of Small Molecule Allosteric Modulators of Glycoprotein Hormone Receptors // Front Endocrinol (Lausanne). 2015. Vol. 6.

7. Schoeller E.L., Schon S., Moley K.H. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis // Cell Tissue Research. 2012. Vol. 349. № 3. P. 839–847.

8. Carruthers M. Testosterone Deficiency Syndrome: Cellular and Molecular Mechanism of Action // Cell and Tissue Research. 2013. Vol. 6. № 1. P. 115–124.

9. Hylmarova S., Stechova K., Pavlinkova G., Peknicova J., Macek M., Kvapil M. The impact of type 1 diabetes mellitus on male sexual functions and sex hormone levels // Endocrinology Journal. 2020. Vol. 67. № 1. P. 59–71.

10. Newton C.L., Anderson R.C. Pharmacoperones for Misfolded Gonadotropin Receptors // Handbook of experimental pharmacology. 2017. Vol. 245. P. 111–134.

УДК 616.8-091.8-006

Винников И.С., Вольхина И.В.

*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
volchinaiv@gmail.com*

NGF В ОНКОЛОГИИ

Фактор роста нервов стимулирует рост и пролиферацию нейронов, а также косвенно индуцирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов, что способствует иннервации и васкуляризации опухоли и, как следствие, прогрессированию заболевания. В связи с этим изучение роли NGF в процессах онкогенеза может создать

предпосылки для нахождения новых путей терапии раковых заболеваний.

Ключевые слова: фактор роста нервов; NGF; TrkA; VEGF; онкологические заболевания.

Vinnikov I.S., Volkhina I.V.

St. Petersburg State Pediatric Medical University

St. Petersburg, Russia

NGF IN ONCOLOGY

Nerve growth factor stimulates neuronal growth and proliferation and indirectly induces vascular endothelial growth factor expression, which contributes to tumor innervation and vascularization and consequently to disease progression. In this regard, study of the role of NGF in oncogenesis may provide background for finding new therapies for cancer.

Keywords: nerve growth factor, NGF, TgkA, VEGF; cancer.

Нейробиология рака относится к актуальному направлению современной онкологии. Исследования последних лет убедительно показывают важную роль нервной системы в процессах канцерогенеза. Изучение этой области открывает новые механизмы развития опухолей, их метастазирования, а также перспективные маркеры и терапевтические мишени.

Фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) является белком семейства нейротрофинов, участвующий в росте, пролиферации и регенерации нейронов. Основные механизмы действия NGF осуществляются через сигнальный путь TrkA (тропомиозин-рецепторную киназу A, нейротрофную рецепторную тирозинкиназу 1) и рецептор нейротрофинов (p75 Neurotrophin Receptor, p75NTR). TrkA является медиатором множественных эффектов NGF, включающих пролиферацию, дифференциацию, рост и созревание нейронов, активацию механизмов выживания клетки. При ослабленном взаимодействии фактора роста нервов с TrkA, например, при падении экспрессии последнего, p75NTR может способствовать апоптозу клетки.

Целями данной работы стали систематизация, анализ и обобщение научных данных о возможных механизмах влияния фактора роста нервов на процессы развития и метастазирования раковых тканей, а также использование NGF в онкологии.

Известно, что подавляющее большинство раковых клеток, вне зависимости от их типа, склонны к сверхэкспрессии NGF [1]. Также, исследования последних лет подтверждают способность фактора роста

нервов неспецифически индуцировать синтез фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), который является сигнальным белком, вырабатываемым клетками для стимулирования васкулогенеза (образования кровеносной системы в эмбриональный период) и ангиогенеза (увеличение количества новых сосудов в уже существующей сосудистой системе). VEGF необходим для восстановления поступления кислорода к тканям в ситуации, когда циркуляция крови недостаточна. Данный эффект NGF приводит к формированию развитой сосудистой сети внутри опухоли. Усиленное кровообращение обеспечивает раковые клетки всем необходимым для дальнейшего деления и метастазирования. Кроме того, ряд протеолитических ферментов, экспрессия генов которых повышается при действии NGF, способствуют инвазии метастаз в различные органы [1–3].

Сверхэкспрессия NGF раковыми клетками приводит к повышению его содержания в сыворотке крови. Известно также, что уровень фактора роста нервов в сыворотке крови больных может коррелировать с размером опухоли. Эти данные делают NGF возможным неспецифическим онкомаркером, а мониторинг его содержания полезным при прогнозировании развития онкологического заболевания [4, 5].

Опухолевый фактор роста нервов стимулирует прорастание сенсорных ноцицептивных волокон в микроокружение вторично пораженной кости, что объясняет появление боли после начала метастазирования при безболезненной первичной опухоли у онкологических больных. Кислая среда, создаваемая раковыми клетками, а также их некоторые эндогенные продукты сенсибилизируют ионные каналы TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1), представляющие собой суперсемейство трансмембранных белков, преобразующих различные сигналы в изменения потенциала клеточной мембраны и далее в изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , который относится к вторичным мессенджерам. Известно, что на мембране обработанных NGF клеток наблюдается большая плотность TRPV1. Это обусловлено PI3K-опосредованным переносом TRPV1 на плазматическую мембрану [7, 8].

Действие большинства разрабатываемых препаратов для терапии раковых заболеваний, влияющих на работу фактора роста нервов направлено на нарушение взаимодействия NGF с его рецептором TrkA. Антитела к NGF обладают большим потенциалом в лечении хронических болей, в частности болевого синдрома, вызванного раком кости. Кроме того, селективные ингибиторы TrkA способны уменьшать пролиферацию раковых клеток и усиливать действие химиотерапевтических средств [9, 10].

Таким образом, необходимый для пролиферации и выживания нейрональных клеток NGF является возможным маркером прогрессирования опухоли, а также потенциальной мишенью для новых терапевтических подходов ряда онкологических заболеваний. В перспективе препараты, способные эффективно препятствовать взаимодействию фактора роста нервов и TrkA, могли бы как замедлять развитие опухоли, так и купировать болевой синдром, вызванный раком.

Список литературы

1. Jiang J., Bai J., Qin T., Wang Z., Han L. NGF from pancreatic stellate cells induces pancreatic cancer proliferation and invasion by PI3K/AKT/GSK signal pathway // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020. № 24(10). P. 5901-5910. doi: 10.1111/jcmm.15265.
2. Wang J., He C., Zhou T., Huang Z., Zhou L., Liu X. NGF increases VEGF expression and promotes cell proliferation via ERK1/2 and AKT signaling in Müller cells // *Molecular Vision*. 2016. № 25(22). P. 254–263.
3. Menter D.G., Herrmann J.L., Nicolson G.L. The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastasis // *Clinical & Experimental Metastasis*. 1995. № 13(2). P. 67–88. doi: 10.1007/BF00133612.
4. Tzeng H.E., Lin S.L., Thadevoos L.A., Lien M.Y., Yang W.H., Ko C.Y., Lin C.Y., Huang Y.W., Liu J.F., Fong Y.C., Chen H.T., Tang C.H. Nerve growth factor promotes lysyl oxidase-dependent chondrosarcoma cell metastasis by suppressing miR-149-5p synthesis // *Cell Death and Disease*. 2021. № 12(12). P. 1101. doi: 10.1038/s41419-021-04392-2.
5. Li P.Y., Ke X.L., Zhu Q., Tian D.A. Expression and clinical significance of nerve growth factor in primary liver cancer // *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2013. № 21(2). P. 121-124. doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2013.02.011.
6. Jung H.H., Kim J.Y., Cho E.Y., Oh J.M., Lee J.E., Kim S.W., Nam S.J., Park Y.H., Ahn J.S., Im Y.H. Elevated Level of Nerve Growth Factor (NGF) in Serum-Derived Exosomes Predicts Poor Survival in Patients with Breast Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy // *Cancers (Basel)*. 2021. № 13(21). P. 5260. doi:10.3390/cancers13215260.
7. Lozano-Ondoua A.N., Symons-Liguori A.M., Vanderah T.W. Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models // *Neurosci Letters*. 2013. № 557. P. 52–59. doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.003.
8. Stein A.T., Ufret-Vincenty C.A., Hua L., Santana L.F., Gordon S.E. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated

TRPV1 trafficking to the plasma membrane // Journal of General Physiology. 2006. № 128(5). P. 509–522. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609576>.

9. Heinen T.E., Dos Santos R.P., da Rocha A., Dos Santos M.P., Lopez P.L., Silva Filho M.A., Souza B.K., Rivero L.F., Becker R.G., Gregianin L.J., Brunetto A.L., Brunetto A.T., de Farias C.B., Roesler R. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma // Oncotarget. 2016. № 7(23). P. 34860-80. doi: 10.18632/oncotarget.8992.

10. Способы лечения боли, обусловленной раком кости, путем введения антагониста фактора роста нервов. США. RU 2 389 509 C2, заявл. 07.04.2005; опублик. 20.05.2010.

УДК 577.15

***Вохмянина Н.В., Гайковая Л.Б., Павлова Р.Н.,
Асятрян Т.Т., Бутхузи Д.Ш.***

*ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
Natalya.Vokhmyanina@szgmu.ru*

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СУБСТАНЦИИ P НА ГОМЕОСТАЗ КОСТНОЙ ТКАНИ

В статье рассмотрены новые перспективные направления в изучении клеточно-молекулярных механизмов ремоделирования костной ткани и участия в них нейропептида субстанции P (SP). На основании проведенного анализа сделаны основные выводы о перспективности применения SP в практической медицине как возможного фактора, влияющего на успешную реабилитацию пациентов с заболеваниями костно-мышечной системы.

Ключевые слова: субстанция P, костное ремоделирование, гомеостаз костной ткани, моноцитарно-макрофагальные клетки костного мозга (ВММ), мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (СККМ), рецептор нейрокинина1-NK1.

**Vokhmyanina N.V., Gaikovaya L.B., Pavlova R.N.,
Asatryan T.T., Butkhuzi D.Sh.**

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

ANALYSIS OF THE EFFECT THE SUBSTANCE P ON BONE TISSUE HOMEOSTASIS

The article discusses new promising directions in the study of cellular and molecular mechanisms of bone tissue remodeling and the participation of the neuropeptide substance R. Based on the analysis, the main conclusions are made about the prospects in the practical application of SP as a possible factor influencing the successful rehabilitation of patients with diseases of the musculoskeletal system.

Keywords: *substance P, bone remodeling, bone homeostasis, bone marrow monocyte-macrophage cells (BMM), bone marrow stem cells (SCCM), neurokinin-receptor NK1R.*

Введение. В настоящее время болезни костно-мышечной системы (БКМС) являются одним из ведущих фактором инвалидизации значительного числа пациентов во всем мире. По данным литературных источников около 1,71 млрд человек в мире страдают этими заболеваниями. БКМС характеризуются ранним и стойким снижением работоспособности и/или, полным прекращением трудовой деятельности, что становится причиной ухудшения качества жизни и социально-психологической дезадаптации. Установлено, что продолжающийся рост БКМС, прежде всего, связан с увеличением продолжительности жизни и старением населения. Значительный рост частоты заболеваний костно-мышечной системы при отсутствии предупреждения и снижения риска развития тяжелых осложнений, позволил Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) определить, как приоритетное направление, разработку пакета эффективных реабилитационных вмешательств и ресурсов, необходимых для их безопасного и результативного осуществления [1]. В настоящее время выполнению поставленных задач способствует подробное изучение процессов ремоделирования для регуляции и поддержания гомеостаза костной ткани. Большое внимание в этом направлении уделяется роли нейропептидов, в частности, субстанции Р (тахикинин), которая участвует в клеточно-молекулярных механизмах ремоделирования костной ткани.

Цель работы. Провести анализ литературных данных, отражающих современные знания в модулирующем действии субстанции Р (SP) на костную ткань для обоснования перспективности в практиче-

ском применении SP как возможного фактора, влияющего на успешную реабилитацию пациентов с БКМС.

Основная часть. Нейропептиды (НП), как биологически активные соединения, участвующие в регуляции метаболизма и поддержании гомеостаза организма, синтезируются и высвобождаются нейронами. НП структурно представлены небольшими аминокислотными цепочками, имеющие повторяющиеся связи амидного типа (-CO-NH-). Субстанция P (англ. substance P, SP) относится к большому семейству таких нейропептидов, как тахикинины, способных вызывать быстрое сокращение гладких мышц (от греч. «тахи» — быстрый и «kinin» — приведенный в движение). Часть семейства тахикининовых пептидов представляют собой нейрокинины, которые в значительной степени экспрессируются в ядре одиночного тракта продолговатого мозга у человека и млекопитающих. Нейрокинины, к которым относят субстанцию P, имеют свои рецепторы, (NK1, NK2, NK3), из которых только NK1 обладает самым высоким сродством к SP и является основным ее рецептором. Нужно отметить, что NK1, связан с G-белком, который способен активировать и запускать пути сигнальной трансдукции с участием диацилглицерина, DAG, инозитолтрифосфата, IP3 и циклического аденозинмонофосфата, цАМФ. Такая активация сигнальных каскадов приводит к участию субстанции P во многих физиологических и патофизиологических процессах, включая вазодилатацию, сокращение гладкой мускулатуры, секреторное действие, передачу боли, нейрогенное воспаление, ангиогенез и др. [2].

Впервые субстанция P была выделена в 1931 году шведскими фармакологами Ульфом фон Эйлером и Джоном Гаддумом (Euler U.S., Gaddum I.H.) из мозга и кишечника лошади. Полученное в виде порошка (Powder) и условно названное «субстанция P», это соединение обладало гипотензивными свойствами и способностью быстро сокращать гладкие мышцы [3]. Позже, группа американских исследователей (Chang M., Leeman S, et al, 1971) установила структуру SP, состоящей из 11 аминокислот (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met)[4]. В настоящее время изучение субстанции P активно продолжается и направлено на тканевую и видовую специфичности ее рецепторов, влиянии SP на сохранение баланса между процессами остеогенеза и остеорезорбции.

На данный момент установлено, что субстанция P в костной ткани синтезируется сенсорными и симпатическими нервными волокнами. Высвобождаясь из свободных окончаний нервных волокон, SP связывается со своими рецепторами и проникает в костную ткань, где взаимодействует с клетками костной ткани. Как показали эксперименталь-

ные исследования, проведенные на культивированных остеобластных клетках, выделенных из свода черепа крысы [Goto T et al. 2007], блокирование рецептора субстанции P (NK1) ослабляло остеогенную дифференцировку, а ее влияние на костное моделирование становилось возможным только после экспрессии NK1 [5]. Группа других исследователей [Niedermair T et al., 2018], проводившая исследования на линии диких мышей (контрольная группа) и линии мышей с низкой экспрессией гена *Tac1* (ген SP), определяющего отсутствие субстанции P, показала, что у мышей с отсутствием SP наблюдалась повышенная активность щелочной фосфатазы (стандартный маркер формирования кости) и увеличенная скорость апоптоза в период ранней дифференцировки остеобластов. Во время поздней остеогенной дифференцировки у той же группы мышей наблюдалось уменьшение активности щелочной фосфатазы со снижением образования кости. На основании полученных результатов предполагалось, что отсутствие SP у мышей с низкой экспрессией гена *Tac1*, по-видимому, ухудшает выживаемость остеобластов во время остеогенной дифференцировки. Проводимая длительная стимуляция выработки SP (кратковременная стимуляция не дала существенных результатов), на ранней фазе дифференцировки остеобластов (через 14 дней) оказывала положительное влияние на выживаемость остеобластов. В более поздней фазе дифференцировки остеобластов (21 день) эти клетки начинали по-разному реагировать на добавление SP. Дальнейшее изучение этого факта показало, что воздействие на мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (СККМ), микродозами SP (10^{-8} – 10^{-10} M) в течение первых 3 дней культивирования, усиливало клеточную пролиферацию. Однако никаких различий не наблюдалось после 21 дня культивирования, когда СККМ уже дифференцировались в остеобласты или в клетки-предшественники остеокластов. Таким образом, полученные результаты позволили сделать вывод, что отсутствие SP сказывается на клеточной пролиферации в костной ткани. Те же эксперименты проводились на моноциттарно-макрофагальных клетках костного мозга (ВММ) и остеобластах, культивированных у мышей дикого типа (контрольная группа). Полученные результаты показали, что в этих клетках SP продуцировалась эндогенно, а внешнее воздействие на них SP не влияло на клеточную пролиферацию. Эти наблюдения показали, что продукция субстанции P может осуществляться не только нервными волокнами, но клетками костной ткани, которые, вырабатывая SP по принципу обратной связи (механизм аутокринной петли) индуцируют синтез рецептора NK1 в той же самой клетке. Полученные данные подтвердили возможность участия в передаче сигналов различных внут-

рикеточных сигнальных систем. Анализ результатов позволил сделать вывод, что реакция остеобластов на введение SP сильно различается и обусловлена периодом стимуляции, временем культивирования и образованием SP (полное отсутствие SP у мышей с низкой экспрессией гена Tас1 по сравнению с мышами дикого типа) и имеет решающее значение для передачи внутриклеточного сигнала NK1 [6].

Изучение процесса резорбции, в который вовлечены остеокласты, представляющие собой многоядерные клетки, образованные из дифференцированных моноцитарно-макрофагальных клеток костного мозга (BMM), определило значимость лиганд-рецепторной системы RANK/RANKL/OPG как ключевого звена в гомеостазе костной ткани. Установлено, что дисбаланс в гомеостазе костной ткани, как правило, связан с нарушениями во взаимодействии рецептора RANK, его лиганда RANKL и остеопротегерина (OPG). Рецептор RANK, или активатор ядерного фактора каппа (от англ. Receptor activator of nuclear factor kappa-B) — провоспалительный цитокин из молекулярного подсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, расположен на плазматической мембране предшественников остеокластов. Лиганд рецептора RANKL (от англ. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) продуцируется активированными Т-клетками и клетками остеобластного ряда. Взаимодействие рецептора с лигандом приводит к запуску внутриклеточных каскадных механизмов, влияющих на ядерный фактор каппа-В (NF-κB), который в итоге инициирует остеокластогенез (рис. 1). В дальнейшем, сформировавшийся активный остеокласт экспрессирует катепсин К4 (лизосомальная цистеиновая протеиназа) для деминерализации костного матрикса путем подкисления и удаления органического матрикса, с последующей деградацией костного матрикса. В то же время в норме NF-κB индуцирует экспрессию гликопротеина остеопротегерина (OPG), который нейтрализует действие RANKL и позволяет избежать избыточный остеолит [7].

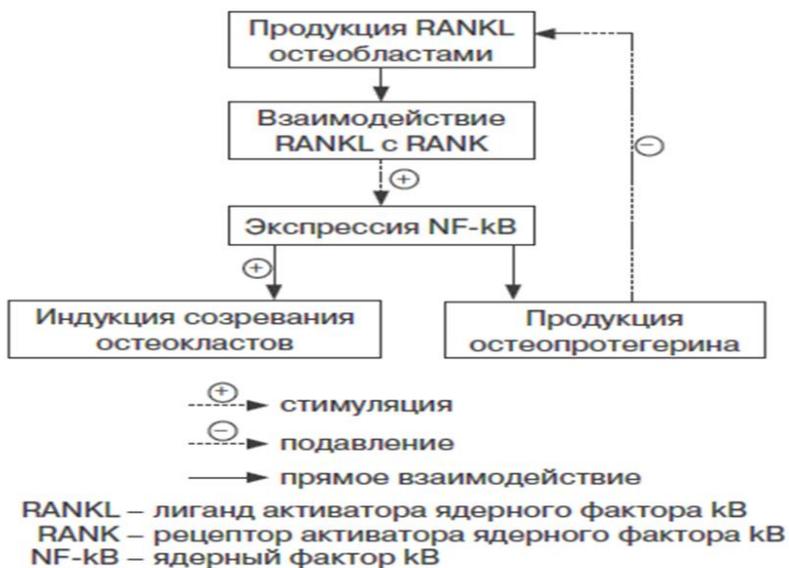


Рис. 1. Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG [7]

Проведенные экспериментальные исследования по изучению воздействия субстанции Р на лиганд-рецепторную систему RANK/RANKL/OPG показали, что SP активирует остеокластогенез путем активации NF-кВ в предшественниках остеокластов (ВММ) аналогично действиям RANKL [6]. Субстанция Р, по-видимому, усиливает RANKL-индуцированный остеокластогенез и резорбцию кости. Так, добавление RANKL к культурам остеокластов индуцировало высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо и приводило к мгновенному увеличению свободного Ca^{2+} , что ускорило ядерную транслокацию NF-кВ. В проведенных исследованиях резкое повышение внутриклеточной концентрации кальция устранялось антагонистами рецептора SP [6]. Таким образом, внутриклеточная мобилизация свободного Ca^{2+} может быть общим сигнальным путем для RANKL и SP, приводящим к активации NF-кВ в макрофагах и остеокластах.

Интересны результаты клинических исследований костно-инженерных конструкций при изучении тканевой инженерии костной ткани, которые выявили влияние субстанции Р на сигнальный путь Wnt (контролирует экспрессию генов, пролиферацию, дифференциацию, миграцию и апоптоз клеток), с привлечением мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (СККМ). Сигнальный путь Wnt, рас-

полагающий большим количеством лигандов, может стимулировать несколько сигнальных каскадов. Важными для костной ткани являются канонический сигнальный путь, влияющий на содержание в ядре клетки β -катенина (внутриклеточный преобразователь сигнала, участвующий в регуляции и координации межклеточной адгезии и транскрипции генов). Активация этого сигнального пути приводит к накоплению в ядре β -катенина, который активирует ядерные факторы транскрипции, в частности Runx2, отвечающего за формирование кости. Влияние субстанции P на канонический сигнальный путь проявляется в изменении дифференцировки СККМ в сторону остеобластной линии, что доказательно сопровождалось увеличением продукции коллагена I типа, остеокальцина и повышением активности щелочной фосфатазы [8]. Помимо этого, влияние субстанции P на сигнальный канонический путь Wnt/ β -катенин сказывалось на экспрессии костного морфогенетического белка II типа, BMP2 (рецептор трансформирующих факторов роста), который индуцирует дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток СККМ в хондро- и остеобласты.

Влияние субстанции P на сигнальный путь Wnt также сказывалось на экспрессии такого сигнального белка, как фактор роста эндотелия сосудов, VEGF. Было установлено, что экспрессия фактора VEGF, стимулирующего новообразование сосудов, происходит на раннем этапе остеогенной дифференцировки СККМ (3-й–7-й день), способствуя формированию ангиогенной способности у СККМ. Эти результаты показали важность влияния субстанции P на васкуляризацию костной ткани, особенно в период регенерации [8].

Недавно был выявлен механизм индукции образования остеокластов путем стимуляции синовиальных клеток с помощью SP, которая освобождаясь из нервных волокон, является одним из факторов риска развития артрита. Субстанция P вызывает синовиальную гиперплазию и гипертрофию, повышает экспрессию RANKL и подавляет экспрессию OPG в синовиальных фибробластных клетках. Это приводит к остеокластогенезу. SP может увеличивать выработку провоспалительных цитокинов, с образованием остеокластов в фибробластах костной ткани. Этот процесс блокировался действием блокаторов рецепторов NK1 [9, 10].

Заключение. Проведенный анализ литературных данных показал важность влияния субстанции P (SP) на процессы ремоделирования костной ткани. Сохранение баланса между процессами остеогенеза и остеорезорбции для поддержания гомеостаза костной ткани, как показали проведенные исследования, является перспективным и требует дальнейшего изучения с целью облегчения тяжести течения и сниже-

ния риска развития тяжелых осложнений болезней костно-мышечной системы. Выявленная возможность регулирования воздействия субстанции P на перечисленные выше процессы, определяет необходимость практического применения SP, особенно для таких заболеваний, как остеопороз, воспалительные заболевания суставов, костные повреждения.

Список литературы

1. Substance P., Graefe SB., Mohiuddin SS. Biochemistry // National library of Medicin [Электронный ресурс]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554583> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554583/>).
2. Fu-Xing-Zi Li, Feng Xu, Xiao Lin, Feng Wu, Jia-Yu Zhong, Yi Wang, Bei Guo, Ming-Hui Zheng, Su-Kang Shan and Ling-Qing Yuan. The Role of Substance P in the Regulation of Bone and Cartilage Metabolic Activity, journal *Frontiers in Endocrinology*. 2020; DOI: 10.3389.
3. Euler USv, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts // *Journal Physiology*. 1931. № 72. P. 74–87. doi: 10.1113/jphysiol.1931.sp002763.
4. Chang M., Leeman S. et al. Amino-acid Sequence of Substance P. // *Nature New Biology*. 232, 86–87 (1971). <https://doi.org/10.1038/newbio232086a0>.
5. Goto T., Nakao K., Gunjigake KK., KidoMA, Kobayashi S., Tanaka T. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1receptors // *Neuropeptides*. 2007. № 41. P. 25–31. doi: 10.1016.
6. Niedermaier T., Schirner S., Seebröcker R., Straub RH., Grassel S. Substance P modulates bone remodeling properties of murine osteoblasts and osteoclasts. *Sci Rep*. 2018 Jun 15. № 8(1). P. 91–99. doi: 10.1038/s41598-018-27432-y. PMID: 29907830; PMCID: PMC6003941.
7. Галстян Г.Р., Каминарская Ю.А. Патогенез остеоартропатии Шарко: роль периферической нервной системы // *Эндокринная хирургия*. 2014. № 1. С. 5–12.
8. Fu S., Mei G., Wang Z., Zou ZL., Liu S., Pei GX., Bi L., Jin D. Neuropeptide substance P improves osteoblastic and angiogenic differentiation capacity of bone marrow stem cells *in vitro*. // *BioMed Research International*. 2014. 596023. doi: 10.1155/2014/596023. Epub 2014 Jun 23. PMID: 25050364; PMCID: PMC4090442.
9. Chao Hu, Qing-Hua Qin. Bone remodeling and biological effects of mechanical stimulus[J]. *AIMS Bioengineering*. 2020. № 7(1). P. 12–28. doi: 10.3934/bioeng.2020002.

10. Susmit Suvas, Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis // The Journal of Immunology. 2017. № 199. P. 1543–1552; DOI: 10.4049.

УДК 612.018

Гаврилова С.О.

ГУ «РНПЦ спорта»

Институт физиологии НАН Беларуси,

Минск, Республика Беларусь

gavrilova.so@yandex.ru

ОСОБЕННОСТИ УРОВНЕЙ ТЕСТОСТЕРОНА И КОРТИЗОЛА ГРЕБЦОВ-АКАДЕМИСТОВ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ УСПЕШНОСТИ СОРЕВНОВАТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

В данной статье проведен анализ соревновательной деятельности гребцов-академистов во взаимосвязи с их гормональным ответом на предъявляемые тренировочные воздействия. Определены уровень кортизола и тестостерона, вычислен индекс анаболизма как маркер восстановления.

Ключевые слова: *гребля академическая, кортизол, перетренированность, тестостерон, индекс анаболизма.*

Gavrilova S.O.

Republican scientific and practical center of sports

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,

Minsk, Belarus

gavrilova.so@yandex.ru

FEATURES OF TESTOSTERONE AND CORTISOL LEVELS OF ROWERS-ACADEMISTS FOR PREDICTING THE SUCCESS OF COMPETITIVE ACTIVITY

This article analyzes the competitive activity of academic rowers in relation to their hormonal response to the training effects. The levels of cortisol and testosterone were determined, the anabolism index was calculated as a marker of recovery.

Keywords: *rowing, cortisol, overtraining, testosterone, anabolism index.*

Введение. Выполнение тренировочных нагрузок вне зависимости от спортивной дисциплины приводит к метаболическим сдвигам, ко-

торые являются мощными раздражителями, вызывающими гормональные изменения. Поиск маркеров уровня гуморальной регуляции процессов анаболизма/катаболизма в ответ на повреждение мышц и направленность этих изменений позволит более точно контролировать тренировочный процесс [1].

В современном спорте часто наблюдают перетренированность спортсмена, развитие состояний, которые характеризуются ухудшением работоспособности, нарушением нейрогуморальной регуляции физиологических функций. Это и изменения в работе коры надпочечников, гипофиза, поражение мышечной ткани, снижение запаса гликогена в мышцах, ухудшение аэробной, дыхательной и сердечной эффективности, понижение психологического тонуса, и как крайность, возникновение различных заболеваний. Диагностирование эндокринных нарушений свидетельствует о переходе адаптивной реакции в повреждающую фазу [2]. В связи с этим актуальным является изучение различных аспектов дозирования и интенсивности физических нагрузок у спортсменов циклических видов спорта и своевременное диагностирование состояния перетренированности.

Одной из причин перетренированности спортсменов является психологическая усталость, слабая мотивация, а также развитие процессов торможения или очага доминанты в коре головного мозга, в отделах, которые ответственны за координацию и двигательную активность, обеспечивающие высокий профессионализм в спорте высших достижений. Еще одним из механизмов развития состояния перетренированности является изменение регуляторных функций центральной нервной системы, что выражается в нарушении нейроиммунного и нейроэндокринного сопряжения. Ведущая роль в этом принадлежит осям гипоталамус-гипофиз-надпочечники (кортизол) и гипоталамус-гипофиз-гонады (тестостерон) [3, 4]. Следует отметить, что существует эффект перепрограммирования в этих осях, благодаря установленному взаимодействию с клеточными популяциями гиппокампа и амигдалы — структур лимбической системы мозга, отвечающей за процессы формирования памяти, ориентирования в пространстве и эмоциональное восприятие информации, соответственно [5]. Гиппокамп взаимодействуя с корой головного мозга и гипоталамусом, принимает участие в суточной регуляции уровня кортизола, регулирует активность оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники [6].

Программы подготовки, неадекватные физиологическим и нервно-психическим возможностям спортсменов, со временем приводят к перенапряжению. Основными причинами хронического стресса в спорте

является несоответствие темпов модификации мышечных воздействий и скорости изменения физиологических и психических функций.

Мониторинг биохимического статуса спортсменов на различных этапах тренировочной и соревновательной деятельности позволяет на ранних стадиях выявить возникновение преморбидных состояний, лимитирующих физическую работоспособность [7].

В дополнение к определению стандартных биохимических маркеров (например, лактата, аммиака и мочевины) и ферментов (например, креатинкиназы) в настоящее время исследуются перспективы включения в процедуры мониторинга тренировок дополнительные измерения уровня гормонов в крови. Эндогенные гормоны принимают участие в физиологических реакциях и адаптации во время физической работы и влияют на фазу восстановления после тренировки, модулируя анаболические и катаболические процессы. Тестостерон и кортизол играют важную роль в метаболизме белков, а также в углеводном обмене. Оба являются конкурентными агонистами на уровне рецепторов мышечных клеток.

Уровень кортизола отражает степень тренировочного стресса у спортсменов. С повышением содержания кортикостероидов усиливается защитная функция организма. Изменения в концентрации кортизола в крови у испытуемых обуславливают полифазность реакций гипоталамо-надпочечниковой системы в результате интенсивной физической нагрузки. Общебиологический аспект половых гормонов, в частности тестостерона, несмотря на свою специфическую роль в репродуктивных процессах, чрезвычайно значим при обеспечении процесса анаболизма.

В то же время именно снижение уровня кортизола в крови и отсутствие его повышения в ответ на интенсивные физические нагрузки является одним из значимых маркеров хронического физического перенапряжения и синдрома перетренированности [6–7], причем, при снижении уровня кортизола наблюдают негативные изменения психоэмоционального состояния. Действие кортизола, как известно, вызывает различные физиологические, когнитивные и поведенческие изменения, имеющие решающее значение для успешной адаптации к стрессу. Первоначально основное внимание привлекала энергетическая роль кортизола в стрессовой реакции [8]. Со временем, однако, все больше внимания стали уделять другому аспекту действия кортизола — угнетению секреции кортиколиберина (и, соответственно, адренокортикотропного гормона). Согласно современным воззрениям, действуя по принципу обратной связи, кортизол снижает интенсивность стрессовой реакции и защищает всю систему от перегрузки [9–10].

Кортизол отражает уровень тренировочного стресса у спортсменов. С повышением уровня кортикостероидов усиливается защитная функция. Изнуряющие физические нагрузки понижают уровень тестостерона. С целью изучения особенностей метаболических процессов у обследуемых и для уточнения реакции протекания анаболических / катаболических процессов необходимо исследовать индекс анаболизма [10].

Изменения в содержании кортизола в крови у обследуемых объясняются полифазностью реакции гипофизарно-надпочечниковой системы при длительной физической нагрузке. Падение уровня кортизола у спортсменов связано с утомлением, а умеренное повышение позволяет судить о высокой тренированности [10].

Таким образом, соотношение тестостерон/кортизол используется как показатель анаболического/катаболического баланса. Оно снижается в зависимости от интенсивности и продолжительности физических упражнений, а также в периоды интенсивных тренировок или повторяющихся соревнований и может быть обращено вспять регенеративными мерами. Однако соотношение тестостерон / кортизол отражает реальное физиологическое напряжение во время тренировки, а не синдром перетренированности. При этом симпатоадреналовая система может быть вовлечена и в патогенез перетренированности. Перетренированность проявляется нарушением вегетативной регуляции, которая в своей парасимпатикотонической форме характеризуется снижением максимальной секреции катехоламинов в сочетании с нарушением полной мобилизации анаэробных молочнокислых резервов.

Вычисление индекса анаболизма (ИА) является одним из методов определения перетренированности и представляет собой отношение сывороточной концентрации тестостерона к концентрации кортизола, регулирующего анаболические процессы во время восстановления. перетренированности ИА рассматривают в качестве информативного маркера восстановления спортсменов. Снижение величины ИА ниже 3% свидетельствует о состоянии перетренированности [10].

Целью данного исследования стало изучение взаимосвязи гормонального фона гребцов-академистов с их результатами соревновательной деятельности.

Материалы и методы исследования. В исследовании приняли участие 66 спортсменов-добровольцев сборной команды Республики Беларусь по гребле академической среди юниоров и молодежи. Среди них 31 мужчина (кандидат в мастера спорта (КМС) — 16 человек, мастер спорта (МС) — 15 человек) и 35 женщин (кандидат в мастера

спорта (КМС) — 17 человек, мастер спорта (МС) — 17 человек, мастер спорта международного класса (МСМК) — 1 человек.

Исследования проводили в общеподготовительный и специально-подготовительный периоды годичной подготовки. Все спортсмены были разделены на две группы; 1-я группа — спортсмены, которые прошли отбор и заняли 1–4-е места на международных соревнованиях (Чемпионат Европы и Чемпионат Мира), 2-я группа — спортсмены, не прошедшие отбор на международные соревнования. Забор капиллярной крови осуществлялся утром натощак в начале недельного микроцикла после дня отдыха с целью определения уровня восстановления. Гормональные исследования (изучение уровня кортизола и тестостерона) проводили в лаборатории биохимии ГУ «РНПЦ спорта» с использованием фотометра для микропланшетов HiPo MPP 96 (Латвия).

Анализ базы данных проводили с использованием программного обеспечения «SPSS Statistics 21». Для накопления данных и первичной работы с ними применяли программу «Microsoft Excel 2016». Для статистической обработки данных обосновали непараметрический метод, согласно которому выбросы идентифицируются в квартилях. Рассчитывали значения нижнего Q1 (25%) и верхнего Q3 (75%) квартилей, медианы. Для определения оптимального интервала использовали диапазон от нижнего Q1 (25%) до верхнего Q3 (75%) квартилей.

Результаты и их обсуждение. Для оценки уровня тренированности спортсменов и состояния анаболических процессов, были определены такие гормоны, как кортизол и тестостерон, а также рассчитан индекс анаболизма у мужчин. Вычисление «индекса анаболизма» проводили по формуле: ИА (в %) = тестостерон / кортизол × 100. Снижение величины ИА ниже 3% принимали как состояние перетренированности.

В табл. 1 и 2 представлены результаты статистического анализа данных в виде медиан и Q1 (25%) квартиль, Q3 (75%) квартиль у мужчин и женщин.

Таблица 1. Статистические значения уровня кортизола и тестостерона (нмоль/л) у женщин

Показатель	Тестостерон, нмоль/л		Кортизол, нмоль/л	
	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа
Медиана (Me)	4,29	4,32	509,36*	694,25*
Q1 (25%) квартиль	4,11	4,24	444,81	499,04
Q3 (75%) квартиль	4,37	5,85	540,9	710,2

Таблица 2. Статистические значения уровня тестостерона и кортизола (нмоль/л) у мужчин

Показатель	Тестостерон, нмоль/л		Кортизол, нмоль/л		Индекс анаболизма, %	
	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа
Медиана (Me)	14,79	15,65	462,67	431,27	3,59	3,06
Q1 (25%) квартиль	10,72	10,72	330,89	367,34	1,99	2,44
Q3 (75%) квартиль	21,57	27,17	613,23	580,26	5,19	4,99

Как видно из данных представленных в таблице 1, диапазон значений кортизола Q1 и Q3 у женщин во 2-й группе был шире. Значения в двух сравниваемых группах не выходили за пределы физиологического оптимума, однако в группе с низкой результативностью соревновательной деятельности уровень кортизола был достоверно выше на 36,3% (*критерий Вилкоксона* $p < 0,003$). Обращает на себя внимание и то, что уровень кортизола в крови имел тенденцию к снижению у спортсменов с высоким уровнем соревновательной деятельности.

Диапазон значений тестостерона Q1 и Q3 во 2-й группе был шире и составлял от 4,24 до 5,85 нмоль/л, когда в 1-й группе диапазон значений был в границе от 4,11 до 4,37 нмоль/л. В группе с низкой результативностью у некоторых представителей отмечали повышенные уровни тестостерона, что свидетельствует о низкой адаптации организма к предъявляемым тренировочным воздействиям на момент исследования.

Если рассматривать динамику медиан и вариаций содержания тестостерона в диапазоне 25–75% у мужчин, то можно выделить тенденцию к увеличению данного показателя у представителей 2-й группы с низкой результативностью соревновательной деятельности. Однако значения тестостерона не выходили за границы физиологической нормы у обеих сравниваемых групп. Медиана значений уровня тестостерона у 2-й сравниваемой группы была выше — этот факт может свидетельствовать о большем мышечном ответе на предъявляемые нагрузки.

Значения кортизола имели более широкий диапазон значений у 1-й группы с высокой результативностью соревновательной деятельности

и составляли от 330,89 до 613,23 нмоль/л. Полученные данные содержания кортизола не выходили за пределы клинической нормы.

В сравнительной оценке скорости восстановления спортсменов по индексу анаболизма было установлено, что спортсмены 1-й группы с высокой результативностью соревновательной деятельности имели более высокий индекс анаболизма и был равен 3,59%. У 2-й группы спортсменов значения индекса анаболизма составляло 3,06% — значение диагностически близкое к состоянию перетренированности. Данный факт свидетельствует о недостаточном восстановлении организма спортсменов во 2-й группе и свидетельствует о низком уровне тренированности. Снижение значения ИА указывают на существенность стрессорного воздействия и неспособность полноценно восстановиться после интенсивной физической нагрузки.

При сравнении мужчин и женщин следует отметить, что уровень тестостерона одинаково варьирует в 1-й и во 2-й сравниваемых группах. В 1-й группе с высокой результативностью соревновательной деятельности и у мужчин, и у женщин уровень тестостерона ниже, чем во 2-й сравниваемой группы. А вот уровень кортизола у женщин с высокой результативностью ниже по сравнению с женщинами с низкой результативностью соревновательной деятельности, а у мужчин, наоборот, в группе с высокой результативностью значения кортизола выше, чем у представителей группы с низкой результативностью. Умеренное повышение уровня кортизола позволяет судить о высокой тренированности.

Выводы. С учетом изложенного, систематический мониторинг гормонального статуса спортсменов на протяжении всех этапов тренировочного цикла позволяет прогнозировать нарушения физической работоспособности спортсменов в соответствии с объемом, интенсивностью, направленностью и динамикой выполняемой нагрузки, а также своевременно оказать необходимую нутритивную и фармакологическую поддержку.

Текущие результаты указывают на необходимость для исследователей признать, что направленные изменения эндокринных биомаркеров могут не отражать состояние патологии до тех пор, пока величина этого изменения не достигнет критического уровня. Следовательно, необходимы критерии «пограничных значений» для величины таких изменений, и будущие исследования должны решить эту проблему, чтобы улучшить диагностические возможности биомаркеров в спортивной физиологии.

Список литературы

1. Philippou A., Maridaki M., Tenta R., Koutsilieris M. Hormonal responses after eccentric exercise in humans // *Hormones*. 2017. № 16(4). P. 405–413.
2. Фролова О.В. Диагностика нарушений работы различных видов мышечной ткани у спортсменов циклических видов спорта в подготовительном периоде // *Потенциал современной науки*. 2015. № 4. С. 54–58.
3. Солдатов С.К., Малышева Е.В., Засядько К.И., Абашеев В.Ю., Гулин А.В., Ермакова Н.В. Метод оценки уровня функциональной адаптации авиационных специалистов по биохимическим показателям слюнного секрета // *Военно-медицинский журнал*. 2009. № 9. С. 64–67.
4. Rot M., Mathew S.J., Charney D.S Neurobiological mechanisms in major depressive disorder // *CMAJ*. 2009. P. 305–313.
5. Yiallouris A., Tsioutis C., Agapidaki E., Zafeiri M., Agouridis A.P., Ntourakis D. Adrenal Aging and Its Implications on Stress Responsiveness in Humans // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019. P. 54.
6. Guilhem G., Hanon C., N. Gendreau D. Bonneau A. Guével M. Chennaoui Salivary Hormones Response to Preparation and Precompetitive Training of World-class Level Athletes // *Front Physiology*. 2015. P. 333.
7. Никулин Б.А., Родионова И.И. Биохимический контроль в спорте // *Советский спорт*. 2011. С. 228.
8. Petibois C., Cazorla G., Poortmans J-R., Déléris G. Biochemical Aspects of Overtraining in Endurance Sports // *Sports Medicine*. № 32(13). 2002. P. 867–878.
9. Vogeser M., Felbinger T.W., Kilger E. et al. Corticosteroid binding globulin and free cortisol in the early postoperative period after cardiac surgery // *Clinical Biochemistry*. 1999. № 32. P. 213.
10. Sato K., Iemitsu M., Katayama K., Ishida K., Kanao Y., Saito M. Responses of sex steroid hormones to different intensities of exercise in endurance athletes // *Experimental Physiology*. 2016. P. 168–175.

УДК 612.015.6

Гайковая Л.Б., Евтеева Д.А., Вохмянина Н.В.
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
Larisa.Gaikovaya@szgmu.ru

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА МТНFR677СТ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ГОМОЦИСТЕИНА, ВИТАМИНА В₁₂ И ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ И ИСХОД У ПАЦИЕНТОВ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Для пациентов с новой коронавирусной инфекцией характерно развитие гипергомоцистеинемии. Одной из причин повышения гомоцистеина в крови является наличие генетических мутаций МТНFR677. Проанализированы концентрации фолиевой кислоты, витамина В₁₂ и гомоцистеина у пациентов с коронавирусной инфекцией в зависимости от генотипа гена МТНFR677.

Ключевые слова: гомоцистеин, новая коронавирусная инфекция, МТНFR677.

Gaikovaya L.B., Evtееva D.A., Vokhmyanina N.V.
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
St. Petersburg, Russia

EFFECT OF POLYMORPHISMS OF THE МТНFR 677C T GENE ON THE CONCENTRATION OF HOMOCYSTEINE, VITAMIN В₁₂ AND FOLIC ACID AND OUTCOME IN PATIENTS WITH A NEW CORONAVIRUS INFECTION

Patients with a new coronavirus infection are characterized by the development of hyperhomocysteinemia. One of the reasons for the increase in homocysteine in the blood is the presence of genetic mutations of МТНFR 677. Concentrations of folic acid, vitamin В₁₂ and homocysteine were analyzed depending on the genotype of the МТНFR677 gene.

Keywords: hyperhomocysteinemia, new coronavirus infection, МТНFR677.

Введение. 5,10- Метилентетрагидрофолатредуктаза (МТНFR) является ключевым ферментом в метаболизме фолиевой кислоты и гомоцистеина. МТНFR катализирует восстановление 5, 10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат [1]. Ген МТНFR локализован на коротком плече 1 хромосомы (1p36.3) и состоит из 11 экзонов. Существует множество изменений последовательности ДНК,

наиболее известными являются 677СТ и 1298АС, которые представлены несколькими вариантами генотипов: МТНFR 677 СС, МТНFR 677 СТ, МТНFR 677 ТТ и МТНFR1298АА, МТНFR1298АС, МТНFR1298СС [2, 3]. Замены аминокислотных последовательностей влияют на термостабильность и активность гена МТНFR. Генетические мутации в данном гене приводят к развитию дефицита фолиевой кислоты, гипергомоцистеинемии и связаны с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, множественными видами рака, осложнениями беременности и дефектами нейрональной трубки [4, 7]. В результате изучения метаболических нарушений у пациентов с новой коронавирусной инфекцией было установлено развитие гипергомоцистеинемии, которая влияет на тяжесть заболевания и исход [1].

Цель исследования. Изучить влияние полиморфных вариантов гена МТНFR677 у пациентов с новой коронавирусной инфекцией на различные исходы заболевания и содержание фолиевой кислоты, гомоцистеина и витамина В₁₂.

Материалы и методы исследования. В исследование включено 22 пациента старше 18 лет с новой коронавирусной инфекцией с положительным ПЦР тестом, находившихся на стационарном лечении в ФГБОУ СЗГМУ имени И.И. Мечникова. Возраст пациентов составил 51,6± 14,4 лет. Клинические исходы включали в себя выздоровление и внутрибольничную смерть. Забор венозной крови осуществлялся в соответствии со стандартными лабораторными процедурами при поступлении пациентов в клинику. Для исследования использовали пробирки с КЗ-ЭДТА. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора Проба-Рapid- Генетика (ДНК-технология, Россия). Определение полиморфизма генов, ассоциированных с риском развития нарушений фолатного цикла:

МТНFR (метилентетрагидрофолатредуктаза, 677 С>Т и 1298 А>С), МTR (метионин-синтаза, 2756 А>G), МTRR (метионин-синтаза-редуктаза, 66 А>G) использовали набор реагентов Генетика метаболизма фолатов (ДНК-технология, Россия) методом ПЦР в режиме реального времени на детектирующем амплификаторе DT lite (ДНК-технология, Россия).

Статистическая обработка проводилась с помощью программы Jamovi 2.3. Числовые значения представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей (Ме [Q1–Q3]). Для сравнения независимых количественных переменных использовали критерий Краскела–Уоллиса, для сравнения качественных данных — критерий χ^2 Пирсона с поправкой на правдоподобие. Статистически значимыми принимались значения $p < 0,05$.

Результаты. При исследовании полиморфизмов генов MTHFR у пациентов с новой коронавирусной инфекцией распределение по генотипам было представлено вариантами: MTHFR 677CC — 45,5% (10 человек), MTHFR 677CT — 45,5% (10 человек), MTHFR 677TT — 9,1% (2 человека).

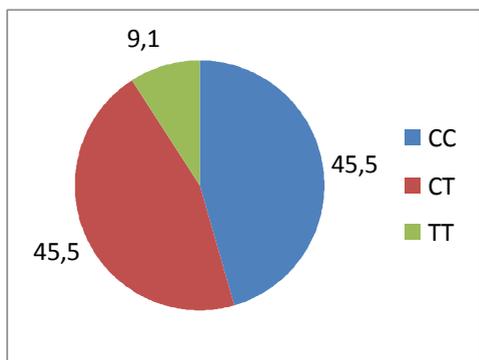


Рис. 1. Распределение генотипов MTHFR677

Была проведена оценка показателей одноуглеродного метаболизма в зависимости от генотипа MTHFR 677C> T (табл. 2). У пациентов с генотипом TT наблюдались наиболее низкие средние значения концентрации фолиевой кислоты (1,31 нг/мл [1,13;1,5]) и витамина B12 (359 нг/мл [333;385]) в сыворотке крови при поступлении по сравнению с референтными интервалами и генотипом CC (фолиевая кислота: 7,5 [5,23;11,3] и витамин B₁₂: 716 [424;913]) и генотипом CT (фолиевая кислота: 4,74 [1,82;9,23] и витамин B₁₂: 650 [263;754]). При этом статистически значимых различий между генотипами не выявлено. Уровень гомоцистеина в сыворотке крови у пациентов с генотипом TT (26,9[25,7;28,0] мкмоль/л) значительно выше по сравнению с пациентами генотипов CC (15,6[14,0;17,3] мкмоль/л) и CT (17,1[14,8;27,9] мкмоль/л), $p=0,139$.

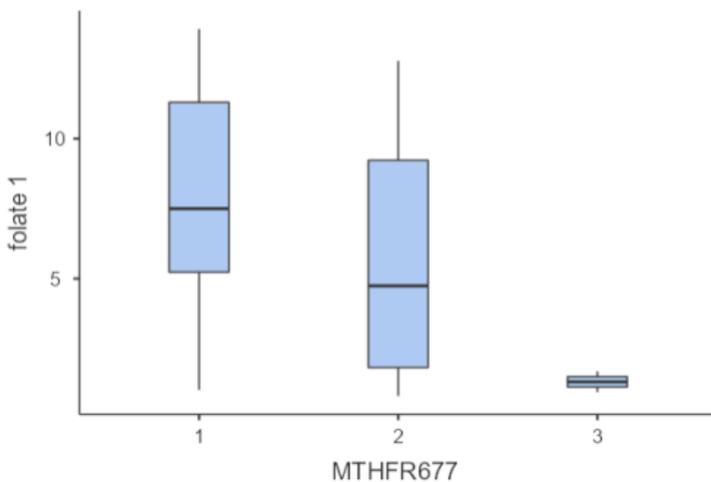


Рис. 2. Концентрация фолиевой кислоты у пациентов с новой коронавирусной инфекцией при поступлении Me [Q1–Q3] в зависимости от генотипа MTHFR 677C>T.

1 — генотип CC; 2 — генотип CT; 3 — генотип TT

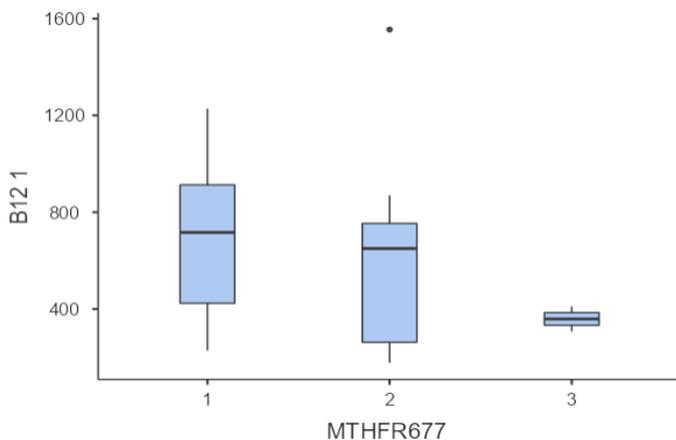


Рис. 3. Концентрация витамина B₁₂ у пациентов с новой коронавирусной инфекцией при поступлении Me [Q1–Q3] в зависимости от генотипа MTHFR 677C>T.

1 — генотип CC; 2 — генотип CT; 3 — генотип TT

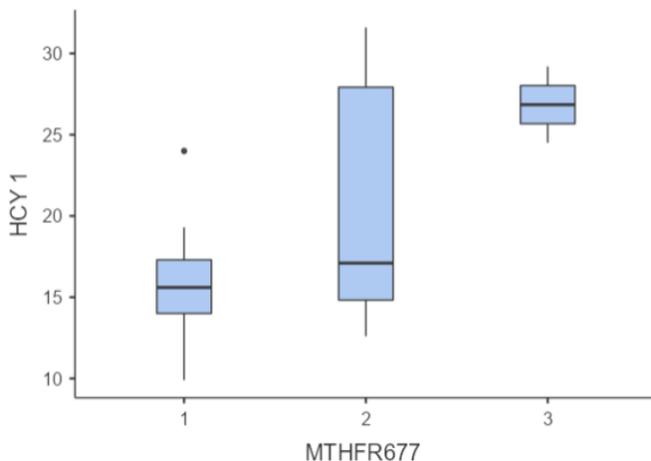


Рис. 4. Концентрация гомоцистеина у пациентов с новой коронавирусной инфекцией при поступлении Me [Q1–Q3] в зависимости от генотипа MTHFR 677C>T.

1 — генотип CC; 2 — генотип CT; 3 — генотип TT

Проведен анализ влияния генотипов MTHFR на клинический исход у пациентов с новой коронавирусной инфекцией (табл. 1). Статистически значимых различий не было выявлено.

Таблица 1. Клинические исходы у пациентов с новой коронавирусной инфекцией в зависимости от генотипа MTHFR 677C>T

Исход	MTHFR 677CC	MTHFR 677CT	MTHFR 677TT	p
Выздоровление	36,4% (8)	31,8% (7)	9,1% (2)	0,628
Летальный исход	9,1% (2)	13,6% (3)	0	

Обсуждение. На основании полученных данных нами установлено, что генотипы MTHFR677 не повлияли на исход заболевания у пациентов с новой коронавирусной инфекцией. Апостериорный анализ, проведенный китайскими исследователями, показал взаимосвязь смертности и уровня гомоцистеина у пациентов с артериальной гипертензией без инфаркта или инсульта в анамнезе, в то время как генотип MTHFR сам по себе мало влиял на смертность, он значительно модифицировал связь гомоцистеина со смертностью, которая была намного сильнее в генотипе CC/CT, чем в генотипе TT [8].

Проведенное нами исследование показало, что у пациентов с генотипом ТТ ген MTHFR677 приводит к снижению активности фермента и как следствие к гипергомоцистеинемии. Наши данные согласуются с результатами других исследователей J. Ni et al. (2017 г.), которые в своем исследовании отмечали, что у людей с генотипом MTHFR ТТ уровень гомоцистеина выше, чем у здоровых людей с генотипом СС/СТ, а уровень фолиевой кислоты были значительно ниже по сравнению с генотипом СС [5]. Дефицит фолиевой кислоты и гипергомоцистеинемия являются факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний [6]. По данным метаанализа повышение уровня гомоцистеина у пациентов с генотипами СТ/ТТ было связано в развитии инсульта, ишемической болезни сердца, тромбоэмболии легочной артерии [4].

Заключение. Определение генотипов MTHFR677 является значимым дополнением к выявлению дефицита фолиевой кислоты и гипергомоцистеинемии у пациентов с коронавирусной инфекцией. Исследование влияния полиморфных вариантов этого гена на клинические исходы у пациентов с новой коронавирусной инфекцией требует дальнейшего изучения, в связи с небольшой выборкой пациентов, а также отсутствием данных об отдаленных последствиях.

Список литературы

1. Вохмянина Н.В., Гайковая Л.Б., Евтеева Д.А., Власова Ю.А. Гомоцистеин как предиктор тяжести течения коронавирусной инфекции: биохимическое обоснование. Лабораторная служба. 2022. № 11(1). P. 43–50. Vokhmianina NV, Gaikovaya LB, Evteeva DA, Vlasova YuA. Homocysteine as a predictor of the severity of coronavirus infection: biochemical justification. Laboratory Service. 2022. № 11(1). P. 43–50. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/labs20221101143>.
2. Boushey C.J., Beresford S.A., Omenn G.S., Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA. 1995 Oct 4. № 274(13). P. 1049–57. doi:10.1001/jama.1995.03530130055028.
3. CDC. MTHFR Gene, Folic Acid, and Preventing Neural Tube Defects. <https://www.cdc.gov/ncbddd/folicacid/mthfr-gene-and-folic-acid.html>.
4. Faraci FM. Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2003. № 23. P. 371–373. DOI: 10.1161/01.ATV.0000063607.56590.7F.
5. Ni J., Zhang L., Zhou T., Xu WJ., Xue JL., Cao N., Wang X. Association between the MTHFR C677T polymorphism, blood folate and vitamin B₁₂ deficiency, and elevated serum total homocysteine in healthy individuals in Yunnan Province, China. J Chin Med Assoc. 2017 Mar. № 80(3).

P. 147–153. doi: 10.1016/j.jcma.2016.07.005. Epub 2017 Jan 13. PMID: 28094233.

6. Raghubeer S., Matsha TE. Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. *Nutrients*. 2021 Dec. 20. № 13(12). P. 45–62. doi: 10.3390/nu13124562. PMID: 34960114; PMCID: PMC8703276.

7. Yamada K., Chen Z., Rozen R. and. Matthews R.G., «Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 98. № 26. P. 14853–14858.

8. Xu B., Kong X., Xu R., Song Y., Liu L., Zhou Z., Gu R., Shi X., Zhao M., Huang X., He M., Fu J., Cai Y., Li P., Cheng X., Wu C., Chen F., Zhang Y., Tang G., Qin X., Wang B., Xue H., Chen Y., Tian Y., Sun N., Cui Y., Hou FF., Li J., Huo Y. Homocysteine and all-cause mortality in hypertensive adults without pre-existing cardiovascular conditions: Effect modification by MTHFR C677T polymorphism. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Feb. № 96(8). P. 58–62. doi: 10.1097/MD.0000000000005862. Erratum in: *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jun 02. № 96(22). P. 7120. PMID: 28225483; PMCID: PMC5569412.

УДК 575.1:616.1

**Голованова Н.Э.^{1,2}, Басанько А.В.¹,
Астратенкова И.В.¹, Лукьянова И.Ю.^{1,2}**

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»,

²ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,

Санкт-Петербург, Россия

nesh1764@mail.ru, 9xaasaax9@gmail.com, astratenkova@mail.ru,

irina.loukianova@yahoo.com

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

В статье представлены результаты исследования ассоциации полиморфизма генов супероксиддисмутазы (SOD2, C47T, rs4880), каталазы (CAT, -262C/T, rs1001179) и ангиотензиногена (AGT, C521T, rs4762) с риском развития сердечной недостаточности.

Ключевые слова: полиморфизм генов, антиоксидантная система, каталаза, супероксиддисмутаза, ангиотензиноген, артериальная гипертензия, сердечная недостаточность.

**Golovanova N.E.^{1,2}, Basanko A.V.¹,
Astratenkova I.V.¹, Lukyanova I.Yu.^{1,2}**

¹*St. Petersburg State University,*

²*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,*

St. Petersburg, Russia,

nesh1764@mail.ru, 9xaasaax9@gmail.com, astratenkova@mail.ru,

irina.loukianova@yahoo.com

ASSOCIATION OF ANTIOXIDANT SYSTEM ENZYME GENE POLYMORPHISMS WITH THE RISK OF HEART FAILURE

This article presents the results of a study on the association of superoxide dismutase (SOD2, C47T, rs4880), catalase (CAT, -262C/T, rs1001179) and angiotensinogen (AGT, C521T, rs4762) gene polymorphisms with the risk of heart failure.

Keywords: *gene polymorphisms, antioxidant system, catalase, superoxide dismutase, angiotensinogen, arterial hypertension, heart failure.*

Введение. Роль активных форм кислорода (АФК) в патогенезе ИБС, атеросклероза, артериальной гипертензии (АГ) в настоящее время доказана [1–3]. Дисбаланс про- и антиоксидантных процессов оказывает прямое цитотоксическое действие на все компоненты клетки, включая белки, липиды и ДНК, за счет образования супероксидного радикала O_2^- , перекиси водорода H_2O_2 , гидроксильного радикала OH^* , перекисного радикала RO_2^* , алкоксильного радикала RO^* , синглетного кислорода O_2^1 и др. АФК способны повреждать ферментные комплексы дыхательной цепи и ЦТК, митохондриальную ДНК, изменять активность транскрипционных факторов, включая NF- κ B, AP1. Повышение продукции АФК, индуцируя внутриклеточные сигнальные механизмы, способствует активизации воспалительного процесса, гипертрофических и фиброзных изменений в миокарде [4].

Гены, кодирующие ферменты антиоксидантной системы (АОС), в частности изоформы супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, имеют большое значение в формировании наследственной предрасположенности к инфаркту миокарда (ИМ), ИБС, АГ [5]. Механизмов развития сердечной недостаточности (СН) при ИБС может быть несколько. Ведущим среди них является ИМ. Однако, даже если СН не развилась на раннем этапе ИМ, то нельзя исключить ее появления в более поздний период. Другой механизм систолической дисфункции у больных ИБС связан с таким явлением, как «гибернация» миокарда, являющимся адаптивной реакцией в условиях постоянно сниженного коронарного кровотока. Важным фактором возникновения миокардиальной дис-

функции у больных ИБС является нарушение функции эндотелия коронарных сосудов, которое проявляется в нарушении способности эндотелиальных клеток продуцировать специфические (сосудистые) факторы релаксации (NO, простациклин, фактор гиперполяризации). Доказано, что дисфункция эндотелия активизирует деятельность нейроромонов, ответственных за развитие и прогрессирование хронической сердечной недостаточности (ХСН): эндотелина-1, ренин-ангиотензин-альдостероновой (РААС) и симпат-адреналовой систем, фактора некроза опухоли- α . АГ, по результатам Фремингемского исследования, относится к наиболее распространенным предвестникам ХСН. В 70% случаев наличие АГ предшествует развитию этого синдрома.

В ишемизированной ткани наблюдается резкое необратимое ингибирование активности антиоксидантных ферментов, что тормозит удаление цитотоксичных продуктов, накапливающихся в условиях ишемии. При этом активация свободнорадикального окисления в зоне ишемии увеличивает некроз ишемизированных клеток. Продукты перекисного окисления липидов усиливают агрегацию тромбоцитов, ишемию миокарда. Активация липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты при значительном увеличении активности фермента 5-липоксигеназы, приводит к образованию лейкотриенов, оказывающих коронарораспастическое действие, усугубляя течение ИБС.

С целью изучения ассоциации полиморфизма генов ферментов АОС с риском развития СН было проведено исследование на базах поликлиник города Санкт-Петербурга и Ресурсного центра СПбГУ. Исследование проводилось при наличии информированного согласия испытуемых.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 33 испытуемых с АГ, в том числе 18 (54,55%) мужчин и 15 (45,45%) женщин. Диагноз АГ устанавливался до включения в исследование на основании данных анамнеза, жалоб, клинической картины заболевания, факторов риска, данных клинического, лабораторного и инструментального методов обследования, согласно рекомендациям ВНОК 2010 г. Длительность АГ варьировала от 2 до 30 лет. Величина систолического АД в выборке варьировала от 140 до 250 мм рт.ст. и составила в среднем $162,87 \pm 8,19$ мм рт.ст. Величина диастолического АД варьировала от 80 до 150 мм рт.ст., составила в среднем $95,75 \pm 4,65$ мм рт.ст.

В соответствии с целью и задачами исследования выборка была разделена на 2 группы. Группа А — включала 20 пациентов с АГ без осложнений, у которых были исключены причины развития вторичной АГ; осложнения АГ (гипертонические кризы; нарушения мозгового

кровообращения (геморрагические или ишемические инсульты)); ИМ; нефросклероз; СН; расслаивающая аневризма аорты. Группа Б — состояла из 13 пациентов с АГ, постинфарктным кардиосклерозом и ХСН 2 ФК.

Геномную ДНК выделяли из эпителиальных клеток ротовой полости, используя коммерческий набор «ДНК-сорб-А» (ООО «ИнтерЛаб-Сервис», Москва). Генотипирование образцов ДНК проводили с использованием наборов реагентов для ПЦР в реальном времени фирмы «Синтол» (Москва). Определение полиморфных вариантов генов выполняли на приборе «Real-time CFX96 Touch» (BioRad, США) в лаборатории Ресурсного центра СПбГУ. У испытуемых определяли полиморфизм гена CAT (-844G>A), кодирующего каталазу, гена AGT (C521T, rs4762), кодирующего белок ангиотензиноген, и гена SOD2 (C47T, rs4880), кодирующего митохондриальную СОД.

Статистический анализ материала проводился с использованием программы Microsoft Excel-2013. Достоверность полученных результатов оценивалась с помощью критерия Манна-Уитни для несвязанных выборок и углового критерия Фишера. Различия считались достоверными при уровне $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При анализе полиморфизма гена AGT в группе пациентов с АГ без осложнений было установлено, что частота встречаемости полиморфизма C521T гена AGT была следующей: СС — 15 чел. (75,0%), СТ — 5 чел. (25,0%). Частота встречаемости варианта СС была достоверно выше, чем СТ ($p < 0,01$). Анализ частоты встречаемости полиморфизма C521T гена AGT в группе пациентов с осложненным течением АГ выявил, что у достоверного большинства пациентов (9 чел. — 69,23%) отмечался вариант СС, тогда как вариант СТ был зафиксирован лишь в 4 (30,77%) случаях ($p < 0,05$). Вариант ТТ в группе отсутствовал. В исследованиях по поиску ассоциации генетического маркера C521T с наличием патологических состояний выявлено, что присутствие в генотипе аллеля Т существенно увеличивает риск развития гипертензии. Следовательно, генотип ТТ гена AGT представляется наиболее клинически значимым для дальнейшего изучения ассоциации с сердечно-сосудистой патологией. Этот генотип связан с повышением концентрации ангиотензиногена, что может приводить к увеличению содержания ангиотензина II [6].

Частота встречаемости полиморфизма гена CAT (-844G>A) в группе А составила: GG — 10 чел. (50,0%), GA — 9 чел. (45,0%) и AA — 1 чел. (5,0%). В группе пациентов с осложненным течением АГ распределение генотипов составило: GG — 46,15% (6 чел.), GA — 53,85% (7 чел.), AA не был выявлен. Полиморфизм -844G>A локализован в про-

моторной области гена, включает многочисленные транскрипционные факторы и существенно влияет на транскрипционную активность гена CAT. Установлена ассоциация этого полиморфизма с активностью фермента CAT. У носителей генотипа AA отмечалась более низкая активность фермента по сравнению с таковой у генотипа GG [7].

При изучении частоты встречаемости носителей различных генотипов гена SOD2 (C47T, rs4880) среди пациентов с неосложненной АГ было установлено, что вариант CC встречался у 4 чел. (20,0%), CT — в 12 (60,0%) случаев и TT — у 4 пациентов (20,0%). Анализ частоты встречаемости носителей различных генотипов гена SOD2 в группе Б составил: CC — 3 чел. (23%), CT — 6 чел. (46%), TT — 4 чел. (30%). Установлено, что на активность SOD2 оказывает влияние полиморфизм Ala16Val (или C47T, rs4880). Полиморфизм C47T приводит к замене аминокислоты аланин на аминокислоту валин, изменяет вторичную структуру белка и снижает транспорт фермента из цитоплазмы в матрикс митохондрий. Установлено, что у носителей аллеля T гена SOD2 наблюдается уменьшение активности фермента SOD2 в митохондриях на 30–40% и возрастает риск развития сердечно-сосудистой патологии [8].

При сравнительном анализе данных, полученных в группах А и Б, отмечена тенденция увеличения неблагоприятных генотипов в группе пациентов с осложненным течением АГ, постинфарктным кардиосклерозом и ХСН 2 ФК. Однако, в связи с малым количеством пациентов, принимавших участие в исследовании, выявленные различия не достигали уровня статистической достоверности ($p > 0,05$). При этом установлено, что в обеих группах пациентов с неосложненной и осложненной АГ носители генотипов SOD2 CT и TT в сумме составили 78,8%, что указывает на наличие у них наследственной предрасположенности к развитию сердечно-сосудистой патологии. Результаты нашего исследования демонстрируют значимость определения полиморфизма митохондриальной SOD2 для оценки риска развития СН.

Список литературы

1. Loperena R., Harrison DG. Oxidative stress and hypertensive diseases // *Medical Clinics of North America*. 2017. Vol. 101. P. 169–93.
2. Wilcox C.S. Asymmetric dimethylarginine and reactive oxygen species: unwelcome twin visitors to the cardiovascular and kidney disease tables // *Hypertension*. 2012. Vol. 59. P. 375–381.
3. Sorriento D., De Luca N., Trimarco B., Iaccarino G. The anti-oxidant therapy: new insights in the treatment of hypertension. // *Frontiers in Physiology*. 2018. Vol. 9. P. 258.

4. Лобанова О.А., Голованова Н.Э., Гайковая Л.Б. Роль митохондриальной дисфункции и нарушений энергетического обмена в патогенезе хронической сердечной недостаточности // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2017. № 6 (103). С. 606–616.

5. Подольская А.А., Галявич А.С., Майкова Е.В., Кравцова О.А., Алимова Ф.К. Роль генов антиоксидантной системы в формировании клинических фенотипов ишемической болезни сердца // Казанский медицинский журнал. 2013. № 2(94). С. 228–234.

6. Sousa T. Role of H₂O₂ in hypertension, renin-angiotensin system activation and renal medullary dysfunction caused by angiotensin II // British journal of Pharmacology. 2012. Vol. 166. № 8. P. 2386–2401.

7. Nadif R., Mintz M., Jedlicka A. et al. Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli // Free Radical Research. 2005. Vol. 39. № 12. P. 1345–1350.

8. Астратенкова И.В., Голованова Н.Э., Селина Е.Н. Актуальность исследования полиморфизма генов ферментов антиоксидантной системы для оценки предрасположенности человека к мультифакторным заболеваниям // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сб. научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой. — СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2020. С. 18–23.

УДК 616-008.9

Дадали В.А.¹, Лейбиман Хаим²

¹ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
кафедра биологической и общей химии им. В.В. Соколовского,
Санкт-Петербург, Россия

²Колледж альтернативной медицины GODELMAN, Израиль
VDadali@mail.ru

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ: ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА

В работе анализируются причины метаболического синдрома как симптомокомплекса, включающего висцерально-абдоминальное ожирение, инсулинорезистентность, гиперинсулинемию, толерантность к глюкозе или сахарный диабет II типа, артериальную гипертензию, дислипидемию, нарушение гемостаза, гипоурикемию, микроальбуминемию. Особое внимание уделяется биохимическим механизмам развития основных клинических проявлений метаболического синдрома, взаимосвязи развития

метаболического синдрома и дефицита микронутриентов: витаминов, макро- и микроэлементов, ω -3 полиненасыщенных жирных кислот. Обсуждается защитная функция антиоксидантной системы.

Ключевые слова: метаболический синдром, дефицит микронутриентов, оксидативный стресс, система антиоксидантной защиты.

Dadali V.A.¹, Leibiman Chaim²

¹*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, department of biological and general chemistry named after V.V. Sokolovsky, St. Petersburg, Russia*

²*GODELMAN College of Alternative Medicine, Israel*

METABOLIC SYNDROME: OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT PROTECTION

The paper analyzes the causes of metabolic syndrome as a symptom complex, including visceral abdominal obesity, insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose tolerance or type II diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia, hemostasis disorder, hypouricemia, microalbuminemia. Particular attention is paid to the biochemical mechanisms of the development of the main clinical manifestations of metabolic syndrome, the relationship between the development of metabolic syndrome and micronutrient deficiency: vitamins, macro- and microelements, ω -3 polyunsaturated fatty acids. The protective function of the antioxidant system is discussed.

Keywords: metabolic syndrome, micronutrient deficiency, oxidative stress, antioxidant defense system.

Метаболический синдром (МС), или синдром X-симптомокомплекс, составными факторами которого, согласно определению группы ВОЗ (1998), является висцерально-абдоминальное ожирение, инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, толерантность к глюкозе или сахарный диабет II типа (СД II типа), артериальная гипертензия, дислипидемия, нарушение гемостаза, гипоурикемия, микроальбуминемия [1].

Основа всех проявлений МС — первичная инсулинорезистентность и сопутствующая системная гиперинсулинемия. Клиническим признаком инсулинорезистентности считается абдоминальный тип ожирения. В его развитии несомненное значение имеет генетическая предраспо-

ложенность и возраст. Существует тесная корреляция между возрастом и количеством висцерального и абдоминального жира, выраженная уже после 30 и особенно у лиц старше 50–60 лет.

Из внешних факторов несомненное значение имеет избыточное питание при микронутриентной недостаточности, техногенные загрязнения, курение, снижение физической активности, хронические стрессорные воздействия и т.д.

По мнению ряда авторов [2–4], это является следствием возрастного повышения активности гипоталамуса, в результате чего имеет место хроническая избыточность секреции кортизола, что усугубляется соответствующими генетическими факторами. Кортизол стимулирует кортизолзависимую липопротеинлипазу стенок капилляров брюшной стенки и висцеральной жировой ткани, в результате чего увеличивается отложение жира, развивается гипертрофия жировых клеток и характерное абдоминальное ожирение. Кроме того, и сам кортизол снижает чувствительность тканей к инсулину и тормозит пострецепторную утилизацию глюкозы. Абдоминальное ожирение является одним из ключевых моментов развития метаболического синдрома. Именно при этом типе ожирения создаются благоприятные условия для реализации приобретенных и генетически обусловленных нарушений, которые включают гипертрофию адипоцитов, уменьшение плотности распределения инсулиновых рецепторов и/или изменения их нативной структуры, нарушение транспорта, ориентации и функционирования рецепторов в биомембранах, нарушение структуры и функционирования глюкозотранспортных белков, прежде всего глут-2 и глут-4, нарушение внутриклеточной сигнализации и активности ферментов внутриклеточного метаболизма глюкозы (в частности, гексокиназы). В связи с тем, что избыточное накопление висцеральной жировой ткани является одним из основных патогенетических факторов синдрома инсулинорезистентности (ИР) и МС, ведущее место в профилактике занимает уменьшение массы висцерально-абдоминального жира, что может быть достигнуто изменением образа жизни, прежде всего рациональным низкокалорийным питанием при обеспечении необходимыми микронутриентами (в первую очередь, витаминами, макро-, микроэлементами, антиоксидантами и т.д.), пониженным содержанием в рационе животных гидрогенизированных жиров и холестерина и низким гликемическим индексом, регулярной и адекватной физической нагрузкой, соответствующей мотивацией.

С точки зрения проблемы снижения массы тела необходимо обратить внимание на ставший массовым дефицит микронутриентов, в первую очередь витаминов, макро- и микроэлементов, ω -3 полиненасы-

сыщенных жирных кислот (ПНЖК) и др., которые имеют место из-за их крайне низкого содержания в современной, далекой от натуральной пище. Организм вынужден компенсировать эти дефициты за счет большего количества потребляемой пищи, что при недостаточной физической нагрузке является одной из причин избыточного веса. Поэтому устранение дефицитов — вопрос не только нормализации всех звеньев метаболизма, но и важный этап снижения веса.

К группе высокого риска формирования синдрома ИР относятся дети, родившиеся с низким весом (менее 2,5 кг). Уже в возрасте 9–11 лет у таких детей обнаружено достоверное снижение эндотелий зависимой релаксации сосудов и низкий уровень ЛПВП. Такие дети в дальнейшем набирают жировую массу и с возрастом могут иметь избыточную массу тела. С другой стороны, дети, рожденные с избыточным весом (более 4 кг), также относятся к группе риска.

В результате снижения чувствительности клеток-мишеней к действию инсулина нарушается усвоение глюкозы инсулинозависимыми тканями (печенью, мышцами, жировой тканью) и развивается гипергликемия, которая стимулирует дополнительную секрецию инсулина, что приводит к гиперинсулинемии. Исследования диабетического центра в Бостоне показали, что инсулинорезистентность на уровне печени является ключевым фактором в развитии метаболического синдрома и его проявлений.

Интенсивный липолиз, имеющий место в висцеральных адипоцитах, приводит к поступлению в печень, а затем в системный кровоток значительных количеств свободных жирных кислот (СЖК), которые в печени препятствуют связыванию инсулина гепатоцитами, обуславливая развитие инсулинорезистентности на уровне печени, снижение экстракции инсулина печенью и развитие системной инсулинемии [4].

В свою очередь гиперинсулинемия через нарушение ауторегуляции инсулиновых рецепторов усиливает периферическую инсулинорезистентность. Кроме того СЖК подавляют тормозящее действие инсулина на глюконеогенез, что приводит к увеличению продукции глюкозы печенью и развитию гипергликемии натощак. СЖК, поступающие в системный кровоток, нарушают функцию инсулиновых рецепторов и усугубляют ИР (эффект липотоксичности). Необходимо отметить, что в регуляции обмена глюкозы (торможением действия инсулина на глюконеогенез, влиянием на функцию инсулинового рецептора в мышечной ткани) имеет значение и секретируемый адипоцитами пептидный гормон лептин, оказывающий регулирующее действие и на центры аппетита в гипоталамусе. Развивающаяся при этом неспособность β -клеток обеспечивать необходимый повышенный уровень секреции

инсулина приводит к нарушению углеводного обмена и развитию СД II типа, а гипергликемия подавляет функцию β -клеток поджелудочной железы, обуславливая эффект глюкозотоксичности, что и приводит к возникновению порочного круга.

Избыточное поступление в печень СЖК приводит к усилению синтеза триглицеридов, развитию гипертриглицеридемии, а также увеличению продукции ЛПОНП и ЛПНП, элиминирование которых снижается вследствие уменьшения активности липопротеидлипазы. Ситуация усугубляется образованием высокоатерогенного липопротеина(a) при одновременном снижении образования антиатерогенных ЛПВП. Таким образом, налицо все признаки развития дислипидемии и атеросклероза.

Наиболее частым вариантом дислипидемии при метаболическом синдроме является липидная триада: сочетание гипертриглицеридемии, низкого уровня ЛПВП и повышения фракции мелких плотных частиц ЛПНП.

При синдроме инсулинорезистентности имеет место дисфункция эндотелия сосудов, которая рассматривается как первичный эффект, лежащий в основе указанной патологии, поскольку обуславливает снижение транспорта инсулина через эндотелий и развивающуюся ИР и, как следствие последней, — дислипидемию, лактоальбуминемию, коагулопатию, артериальную гипертензию. В то же время все проявления метаболического синдрома (гипергликемия, гиперхолестеронемия и т.д.) усугубляются дисфункцией клеток эндотелия.

Из всех регуляторных факторов, синтезируемых эндотелием, роль базового принадлежит свободному радикалу оксида азота NO^\bullet , который обуславливает расширение сосудов, блокирует пролиферацию гладкомышечных клеток стенок сосудов, препятствует адгезии клеток и обладает антиатерогенным и антиагрегантным действием.

Единственным источником оксида азота в организме, в том числе в клетках эндотелия, является аминокислота L-аргинин, из которой NO^\bullet образуется под действием эндотелиальной NO -синтазы (цинк-зависимый фермент). Дефицит оксида азота может быть следствием как дефицита аргинина в организме, хотя эта аминокислота синтезируется в печени в орнитиновом цикле Кребса, так и активизация перекисных процессов, в результате которых NO^\bullet при неконтролируемом быстром взаимодействии с супероксид-анион радикалом образует крайне токсичный, в том числе для β -клеток поджелудочной железы, пероксинитрит.

Необходимо также напомнить, что в эндотелии идет образование и других vasoактивных факторов, в том числе эйкозаноидов, что определяется балансом ω -6 и ω -3 ПНЖК в питании, который в подавляющем большинстве случаев сдвинут в неблагоприятную сторону и требует длительной коррекции.

Еще одним опасным проявлением МС является артериальная гипертензия и нарушения в свертывающей системе крови.

Воздействие хронической гиперлипидемии на артериальное давление является многоплановым и включает трансмембранные ионно-транспортные механизмы, включая снижение внутриклеточного калия, задержку жидкости и развитие гиперволемии, стимуляции пролиферации гладкомышечных волокон, приводящие к сужению артериол и увеличению сосудистого сопротивления, стимуляцию симпатической нервной системы и активности ренин-ангиотензиновой системы.

Нарушения со стороны гемореологических показателей при абдоминальном ожирении проявляется усилением факторов коагуляции, торможением фибринолитической системы, уменьшением антитромботического потенциала сосудистой стенки и усилением коагулирующей активности свертывающей системы крови, что приводит к формированию склонности к предтромботическому состоянию, существенно повышающего риск тромбонекротических последствий (инфаркта, инсульта).

Изменения со стороны функциональной активности тромбоцитов проявляется в повышении их адгезионной и агрегационной способности, что связано с усилением продукции тромбоксана A_2 и тромбоцитарного фактора роста. Таким образом, тромбоциты вносят существенный вклад (а по некоторым данным и определяющий) в тенденцию к тромбообразованию при синдроме ИР.

В последнее время все большее внимание акцентируется на роли хронического воспаления в возникновении и протекании сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе развитии МС [3]. Накоплена информация о том, что основные факторы риска сердечных заболеваний ассоциируются с воспалением: ожирение ИР и СД II типа, гипертония, высокий уровень липидов, стресс, гиподинамия, повышенный гомоцистеин, депрессия, курение, дефицит микронутриентов. Более того, один из ключевых факторов МС — атеросклероз рассматривается как хроническое иммунное воспаление. Повышенное содержание в крови таких маркеров воспаления, как С-реактивный белок, интерлейкины-1,2,6, фактор некроза опухолей- α , является показателем хронического воспалительного процесса, в силу чего воспаление рассматривается как еще один критерий МС.

Из всего многообразия патологических факторов проявления МС обычно выделяют четыре ключевых (часто называемых «смертельной тетрадой»): ожирение, ИР (СД II типа), гиперлипидемию и артериальную гипертензию, которые характеризуются проявлением общего патогенетического механизма — оксидативного стресса, т.е. повышенным уровнем свободно-радикальных и перекисных процессов, образованием окисленных форм липидов, липопротеинов и белковых факторов, нарушением функций биомембран и мембранных белков, выполняющих рецепторные, сигнальные, транспортные и метаболические функции, в том числе снижением эффективности действия инсулина и уменьшением концентрации белковых переносчиков глюкозы.

Поэтому важной, хотя и не единственной, составной частью профилактики МС должна стать стратегия нормализации функционирования многоуровневой системы антиоксидантной и антиперекисной защиты на всех ее этапах и звеньях с одновременным вниманием к неантиоксидантным метаболическим функциям антиоксидантов. Ключевым и первостепенным моментом в этом плане является постоянное и адекватное обеспечение организма витаминно-минеральными комплексами. Во-первых, последние являются небелковыми компонентами ферментов и ферментных систем всех метаболических процессов — обмена белков, углеводов и липидов, иммунной и детоксицирующей систем и т.д. Во-вторых, практически все витамины, за исключением витамина D, который является прогормоном и имеет самостоятельное значение при МС, проявляют свойства антиоксидантов (АО). Витамины E, C, A, B₆ и восстановленная форма витамина K обладают прямым антиоксидантным действием, выступая как ловушки активных форм кислорода или цепь-обрывающие факторы. Витамины B₉, B₁₂ и B₆ профилактируют образование избыточного гомоцистеина, провоцирующего перекисное повреждение интимы сосудов, развитие атеросклероза и тромбозов. Витамины B₂ и B₃, предварительно трансформируясь в свои коферментные формы (соответственно, в ФАД (ФМН) и НАД⁺ (НАДФ⁺) (при взаимодействии с АТФ и макроэлементом Mg⁺⁺), и микроэлементы Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Mn⁺⁺, а также Fe⁺⁺ (в составе гема) и Se²⁻ (функционируют в структуре активного центра ферментов ферментного звена АО системы. А макроэлемент Mg⁺⁺ является активатором всех АТФ-зависимых ферментов, обеспечивающих энергетический гомеостаз организма, синтетические, транспортные, информационные процессы клеток, тканей и органов.

Однако полноценная антиоксидантная защита в целом и при МС в частности требует активного функционирования и второго уровня АО системы — низкомолекулярных антиоксидантов, к которым относятся

не только упомянутые выше витамины, а значительно более широкий круг микронутриентов, включающий полифенолы, восстановленные хиноны, серосодержащие соединения и т.д. в комбинациях, обеспечивающих синергизм действия и предотвращающих прооксидантные эффекты.

Одним из высокоактивных антиоксидантов, повышающих чувствительность периферических тканей к инсулину и увеличивающих транспорт глюкозы в ткани является природный комплекс витамина Е (комбинация D-изомеров α , β , γ , δ -токоферолов и токотриенолов). Кроме того, витамин Е способствует уменьшению уровня диацилглицерина, обычно повышенного у лиц с гиперинсулинемией, который повышает сосудистый тонус и гиперагрегацию тромбоцитов, а также способствует развитию диабетического гломерулосклероза.

Проведенное в Корее популяционное исследование показало, что низкий уровень витамина Е обратно коррелирует со случаями МС, а в когортном финском исследовании, охватившем более 4260 человек, установлено, что потребление витамина Е снижает риск диабета 2-го типа, инфаркта и инсульта.

Близкие токоферолам D-изомерные α , β , γ , δ -токотриенолы (из рисового и красного пальмового масел) еще более эффективны при МС, включая снижение уровня глюкозы, триглицеридов и холестерина крови и подавление гиперлипидемического и гиперинсулинемического ответов.

Уникальным свойством токотриенолов является их влияние на ключевой фермент синтеза холестерина — ГМГ-редуктазу. В этом плане их синергистом является ликопин, фитостеролы и витамин С, ингибирующие этот фермент и оказывающие благоприятное действие на сердечно-сосудистую систему и по другим механизмам. Тем не менее, антиоксидантные эффекты токоферолов и токотриенолов эффективно реализуются только при достаточной обеспеченности организма витамином С и биофлавоноидами, обеспечивающими синергизм действия и исключающие прооксидантные и токсические эффекты. Синергистом витамина Е является и селен Se^{2+} (в виде селено-метионина либо обогащенных селеном водорослей или дрожжей). Природный витамин С (смесь шести производных L-аскорбиновой кислоты, включая жирорастворимый аскорбилпальмитат) является антиоксидантом в комбинации с флавоноидами или другими природными хелаторами ионов Fe^{++} (или Cu^{+}), провоцирующими перекисное окисление. Помимо антиоксидантного действия витамин С обладает и другими важными эффектами при МС. К ним относятся:

- а) упомянутое выше ингибирующее действие на ГМГ-редуктазу;

б) активирующее действие на холестерин-7 α -гидроксилазу, стимулирующее трансформацию холестерина в желчные кислоты, что способствует снижению холестерина крови (на фоне нормальной микрофлоры кишечника);

в) активирующее действие на липопротеидлипазу стенок капилляров, что способствует снижению уровня триглицеридов крови;

г) торможение образования высокоатерогенного липопротеида (α);

д) снижение уровня гликозилированного гемоглобина и микроальбуминурии у лиц с ИР и СД 2-го типа.

Еще один важный аспект действия композиций с витамином С — стабилизирующее действие на состояние артериальной сосудистой стенки и регуляцию пролиферации клеток гладкомышечных волокон сосудистой. Эти свойства витамина С особенно активно проявляются в его комбинации с аминокислотами лизином и пролином, витамином В₆, микроэлементами медью (Cu^{++}) и железом (Fe^{++}) и полифенолом зеленого чая — эпигаллокатехингалатом (ЭГКГ), что обусловлено формированием и стабилизацией коллагена и эластина сосудистой стенки [5].

Еще один полифенольный комплекс — пикногенол проявляет не только АО активность, но и снижает тощачковый и пострандиальный уровень глюкозы крови при диабете II типа, проявляет противовоспалительный, антигипертензивный, антитромботический эффекты, улучшает симптомы при микроангиопатии и нарушении капиллярной функции.

Благоприятные эффекты полифенолов (ЭГКГ и его аналогов, пикногена) обусловлены антиоксидантной, противовоспалительной активностью и улучшающим состояние эндотелия сосудов действием. Кроме того, ЭГКГ стимулирует продукцию эндотелием одного из важнейших вазодилататоров — оксида азота NO^* обуславливающий расширение сосудов, снижение систолического давления с одновременным повышением чувствительности клеток к инсулину (инсулиномиметический эффект) Одновременно ЭГКГ тормозит пролиферацию адипоцитов, а также усиливает β -окисление жирных кислот и термогенез, что способствует снижению веса.

В связи со способностью ЭГКГ влиять на продукцию эндотелием NO^* необходимо подчеркнуть роль в этом процессе аминокислоты L-аргинина — естественного источника оксида азота во всех тканях, в том числе в эндотелии под действием цинксодержащего фермента NO -синтазы, поэтому L-аргинин занимает одно из центральных мест в профилактике и терапии МС и других сосудистых нарушений. Благодаря этому L-аргинин не только способствует вазодилатации коронар-

ных и периферических сосудов, но и снижению артериального давления, препятствует агрегации тромбоцитов и образованию атеросклеротических бляшек, а по некоторым данным [6], даже регрессии уже существующих. Однако у лиц с заболеваниями сердечно-сосудистой системы содержание L-аргинина часто существенно снижено, в силу его трансформации в диметиларгинин, который ингибирует NO-синтазу, увеличивая дефицит NO.

Ситуация усугубляется при недостаточной нейтрализации супероксид анион радикала супероксиддимутазой (СОД) (например, при дефицитах микроэлементов цинка, меди, марганца) и недостатке биофлавоноидов в рационе [7]. Супероксид анион радикал реагирует с NO, не только снижая его уровень, но и образуя крайне токсичный пероксинитрит. Последний повреждает клетки поджелудочной железы, провоцирует диабетическую нефропатию и нитросативный стресс (синдром Такоубо в сердечно-сосудистой системе) и т.д. Этому активно противодействует природный хинон пирролохинолинхинон pQQ (коммерческий продукт), который, предотвращая образование пероксинитрита, улучшает состояние повреждаемых последним почек и защищает их от диабетической нефропатии. Следует подчеркнуть, что pQQ является активным стимулятором митохондриогенеза, что существенно улучшает энергетику тканей при МС. Особенно эффективна комбинация pQQ с убихинолом (CoQ10 в восстановленной форме) [8]. Именно убихинол, а не убихинон является антиоксидантом, но обе формы функционируют как активаторы митохондриальной системы энергопродукции. В крови здорового человека 95% CoQ₁₀ находится в восстановленной форме, где защищает от перекисного окисления и повышения атерогенности ЛПНП. При диабете уровень убихинола в крови на 75% ниже, причем, чем выше уровень глюкозы в крови, тем ниже уровень убихинола. Именно комбинация pQQ и убихинола является перспективным лечебно-профилактическим средством при МС [8].

Среди серосодержащих антиоксидантов, эффективность которых была показано при МС, следует отметить витаминopodobный метаболит-липовую кислоту (ЛК). ЛК кислота является кофактором одного из ферментов аэробного (энергетического) метаболизма и утилизации глюкозы и функционирует совместно с витаминами B₁, B₂, PP. Она способствует снижению жировой массы и веса тела, нормализации инсулинорезистентности и липидного спектра крови, снижению кровяного давления. Более того, ЛК предотвращает аккумуляцию триглицеридов в скелетной мускулатуре, которая может приводить к инсулинорезистентности. Эффективность действия ЛК существенно повыша-

ется в комбинации с ацетил-L-карнитином за счет синергизма, причем существенно усиливается миокардиальная активность, улучшается утилизация кислорода и окисление жирных кислот в адипоцитах. Обсуждаемые в литературе антиоксидантные свойства ЛК присущи только ее восстановленной форме. Препараты ЛК являются протокольными продуктами лечения диабета и МС и прошли необходимые клинические испытания.

Заключение. Анализ материалов по применению природных веществ при МС позволяет прийти к выводу, что использование природных антиоксидантов с многоплановыми механизмами действия в виде продуктивных комплексов является одним из перспективных подходов в решении проблемы МС.

Список литературы

1. Ройтберг Г.Е. Метаболический синдром. М.: МЕДпресс-информ, 2021. 120 с. ISBN 978-5-00030-832-5.
2. Ford E.S., Giles W.H., Dietz W.H. Prevalence of metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey (англ.) // JAMA: journal. 2002. Vol. 287. № 3. P. 356–359.
3. Чазова И.Е., Мычка В.Б. Метаболический синдром // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2003. № 3. С. 32–38.
4. Grundy SM. Obesity, Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004. № 89. P. 2595–2600.
5. Формула здоровья. Биологически активные добавки к пище. Справочник. Издание 2-е, переработанное и дополненное / под ред. д-ра мед. наук С. Орловой. М.: Альтера Холдинг, 2002.
6. Шабров В.А., Дадали В.А., Макаров В.Г. Биохимические основы действия микронутриентов пищи / под редакцией проф. В.А. Дадали. М.: Авваллон, 2003. 184 с.
7. Гичев Ю.Ю., Гичев Ю.П. Руководство по биологически активным пищевым добавкам. М., 2006. 212 с.
8. Дадали В.А. Процессы перекисного окисления в организме и природные антиоксиданты. // Введение в частную микронутриентологию / под ред. Ю.П. Гичева, Э. Огановой. Новосибирск, 1999. С. 240–265.

УДК 579.61

*Дмитриева М.Е., Шелковникова В.Н., Бельшенко А.Ю.,
Малыгина Е.В., Моргунова М.М., Власова А.А., Имидоева Н.А.,
Тельнова Т.Ю., Аксенов-Грибанов Д.В.*

*ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет»,
Иркутск, Россия
marrie.dmitrieva@gmail.com, shelkovnikova551@gmail.com,
al.belyshenko@gmail.com, cat.perelyaeva@gmail.com,
marymikhmorg@gmail.com, vlasovafippo23@gmail.com,
nat.imidoeva@gmail.com, telnovatamara1410@gmail.com,
denis.axengri@gmail.com*

ОЦЕНКА СИНТЕЗА АНТИОКСИДАНТОВ И НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ ОКСИФИЛЬНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Антиоксиданты представляют собой вещества, которые способны взаимодействовать с активными формами кислорода, приводя к их инактивации. Таким образом, существует необходимость поиска новых источников антиоксидантов для лечения нейродегенеративных заболеваний. В работе показано, что микроорганизмы озера Байкал могут синтезировать антиоксиданты и нейропротекторы.

***Ключевые слова:** нейродегенеративные заболевания, окислительный стресс, оксифильные микроорганизмы, антиоксиданты, нейропротекторы, озеро Байкал.*

***Dmitrieva M.E., Shelkovnikova V.N., Belyshenko A.Yu.,
Malygina E.V., Morgunova M.M., Vlasova A.A.,
Imidoeva N.A., Telnova T.Yu., Axenov-Gribanov D.V.***

*Irkutsk State University,
Irkutsk, Russia*

EVALUATION OF THE SYNTHESIS OF ANTIOXIDANTS AND NEUROPROTECTORS BY OXYPHILIC MICROORGANISMS OF LAKE BAIKAL

Antioxidants are substances that are able to interact with various oxidizing agents and active oxygen forms, thereby leading them to inactivation. Thus, there is a need to find new sources of antioxidants for the treatment of neurodegenerative diseases. The work shows that microorganisms of Lake Baikal can synthesize antioxidants and neuroprotectors.

Keywords: *neurodegenerative diseases, oxidative stress, oxyphilic microorganisms, antioxidants, neuroprotectors, lake Baikal.*

Рынок препаратов для терапии нейродегенеративных заболеваний представляется одним из наиболее интенсивно развивающихся. По сообщениям аналитических агентств GBI research и Mordor intelligence, за последние 20 лет рынок лекарственных препаратов, разработанных для терапии нейродегенеративных заболеваний, увеличился в 4–5 раз и в настоящее время составляет не менее 45 млрд долларов США. В настоящее время клинические испытания на различных стадиях проходят 37 препаратов (по данным реестра выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов Министерства здравоохранения РФ).

Обращаясь к этиологии нейродегенеративных заболеваний, известно, что большинство из них связаны с окислительным стрессом, развивающимся в нервной ткани [9]. Окислительный стресс играет большую роль в развитии таких заболеваний, как ревматоидный артрит, рак, болезни Альцгеймера и Паркинсона. Вместе с тем различные болезни сердечно-сосудистой системы могут быть связаны с патологическими изменениями, наблюдающимися из-за повреждения ДНК и белков [4]. Из-за отсутствия эффективного лечения, нейродегенеративные заболевания являются глобальной проблемой для современного общества [1]. Ожидается, что к 2030 году стоимость лечения нейродегенеративных заболеваний, например, деменции превысит 2 триллиона долларов, а в Великобритании общая сумма потраченных средств уже превышает показатели стоимости по лечению рака и сердечных заболеваний, вместе взятых [7].

Важным решением для разработки новых подходов лечения нейродегенеративных заболеваний может быть поиск новых объектов исследований. Известно, что бактерии синтезируют около 70% всех природных соединений, которые имеют большое значение в медицине и фармацевтике [3]. Среди всего разнообразия микроорганизмов, наиболее редкой и неизученной группой выступают оксифильные микроорганизмы. В наши дни в русскоязычной литературе, такие упоминания, как «оксифильные бактерии», «оксифобные бактерии», крайне редко встречается. В тоже время, именно адаптации к кислороду, как к фактору среды, являются ключевыми для подледных сообществ некоторых водоемов, например, озера Байкал. Экосистема озера Байкал характеризуется высоким процентом эндемичных организмов, низкой концентрацией минеральных солей, низкой температурой воды и экстремально высокой степенью насыщенности воды кислородом. Высо-

вероятно, что данные микроорганизмы обладают выраженными механизмами защиты от окислительного стресса, в частности синтезируют природные соединения с антиоксидантной активностью. В связи с этим мы предполагаем, что в озере Байкал присутствуют уникальные оксифильные микроорганизмы, которые синтезируют природные соединения с высокой антиоксидантной активностью, поскольку сталкиваются с условиями природной гипероксии. Рядом исследований показано, что организмы озера Байкал обладают бесспорным преимуществом по числу новых и ранее неизученных природных соединений, на основе которых могут быть созданы новые лекарственные препараты [8].

Таким образом, целью данной работы являлась оценка влияния повышенных концентраций кислорода на синтез антиоксидантов и нейпротекторов актинобактериями и непосредственно оксифильными микроорганизмами озера Байкал. Исследование состояло из 2 этапов.

В рамках первого этапа эксперимента с актинобактериями был выбран штамм рода *Streptomyces*, выделенный из зообентоса озера Байкал. Штамм культивировали в стандартных условиях естественной аэрации (контрольные условия, концентрация кислорода в колбе — 7,3 мг/дм³), в условиях повышенного содержания кислорода в колбах (экспериментальные условия 1), а также условиях совместного повышенного содержания кислорода и озона (экспериментальные условия 2). В данных условиях концентрация кислорода в колбах составила 24,3 мг/дм³. Качественную оценку антиоксидантной активности проводили с помощью метода DPPH. Оценка состава природных соединений, синтезируемых актинобактериями, проводили при помощи подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии высокого разрешения и использования базы данных Dictionary of Natural products (CRC-press. v.10.1 2019).

В рамках второго этапа эксперимента объектом исследования являлись оксифильные микроорганизмы, выделенные из очагов гипероксии озера Байкал. Для пробоотбора оксифильных микроорганизмов были организованы экспедиции к точкам пробоотбора — в районы западного побережья озера Байкал — в пос. Большое Голоустное и пос. Бугульдейка. Для проведения пробоотборов во льду озера были сделаны отверстия, в которые опущен зонд пробоотборника на глубину 2–3 метров. В точках пробоотбора измерена концентрация кислорода в воде и выбраны зоны с наибольшей концентрацией для отбора образцов байкальской воды — 9,97 мг/мл, 10,78 мг/мл, 11,91 мг/мл, и 12,19 мг/мл. Выделенные штаммы оксифильных микроорганизмов культивировали в условиях повышенного содержания кислорода в

колбах и в условиях холодильной камеры. Оценка антиоксидантной активности и состава природных соединений проведены по аналогии с 1 экспериментом.

При анализе антиоксидантного потенциала, в экстрактах культуральной жидкости и биомассы штаммов при экспозиции в экспериментальных условиях было обнаружено соединение с молекулярной массой 600,3486 Да, идентифицированное как Nocardamine (CAS № 26605-16-3). Данное соединение является антиоксидантом, сидерофором, антибиотиком и синтезируется штаммом только в экспериментальных условиях. Другое природное соединение, характеризующееся массой 599,2496 было идентифицировано как Ferrioxamine A2 (CAS № 1240913-01-2). Данное соединение также синтезируется исключительно в экспериментальных условиях и обнаружено в экстрактах культуральной жидкости и биомассы. Данное соединение является переносчиком железа. Наконец, в ходе работ показано, что природное соединение, характеризующееся массой 707,5335 Да, синтезируется в экспериментальных условиях и обнаружено в экстрактах культуральной жидкости и биомассы. Данное соединение также однократно обнаружено в контрольной группе спустя 3 недели эксперимента. Учитывая, что именно на 3 неделе в контрольном образце отмечали повышение антиоксидантной активности, можно предположить, что именно данное соединение обладает антиоксидантной активностью. При этом, соединение с данной массой не зарегистрировано в базе данных DNP. Более того, было показано, что культивирование штамма *Streptomyces* sp. IB2019M2C-2 при повышенном содержании кислорода и озона ведет к синтезу 3 новых природных соединений в экстрактах культуральной жидкости.

В настоящее время в рамках второго эксперимента проводятся работы по оценке воздействия кислорода на синтез антиоксидантов оксифильными микроорганизмами озера Байкал. В ходе настоящего исследования нами был показан синтез таких антиоксидантов, как N-Acetyl-4-hydroxybenzylamine (масса — 65,0788 Да) (CAS № 34185-04-1) и Arzanol (масса — 402,1681 Да) (CAS № 32274-52-5). Штамм-продуцент в настоящее время проходит идентификацию.

В ходе проведенного исследования, нами был показан синтез антиоксидантов байкальскими микроорганизмами. В исследовании J. Lan показано, что введение такого соединения как Desferrioxamin значительно снижает уровень железа в головном мозге на мышинных моделях болезни Паркинсона [5]. В нашем же исследовании синтез таких соединений как Nocardamine (Desferrioxamin) и Ferrioxamine A2 был индуцирован созданными условиями окислительного стресса, что мо-

жет указывать на участие этих соединений в нейропротекции. Соединение Arzanol, которое синтезируется байкальским оксифильным штаммом, согласно литературным данным, ингибирует перекисное окисление липидов в модели окислительного стресса *in vivo*. Более того, Arzanol также избирательно снижает жизнеспособность линий раковых клеток, например, мышинных клеток меланомы и клеток рака шейки матки человека [6].

Таким образом, показано, что кислород оказывает влияние на микроорганизмы озера Байкал, адаптированные в природе к его высокому содержанию. В ходе данных экспериментов мы подтвердили гипотезу, что микроорганизмы, в том числе оксифилы озера Байкал способны синтезировать природные соединения с антиоксидантной активностью (в том числе новые природные соединения), поскольку сталкиваются с условиями естественной (природной) гипероксии. Учитывая регрессивную динамику обнаружения новых классов природных соединений [2], для решения глобальных проблем, мирового здравоохранения, есть потребность в поиске микроорганизмов — продуцентов новых биологически и фармацевтически активных природных соединений. Микроорганизмы озера Байкал при этом могут выступить потенциальным источником новых молекул для создания лекарственных препаратов.

Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно — образовательных центрах (проект 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал) и Гранта Президента РФ МК-1245.2021.1.4. и грантов ИГУ № 091-22-317, № 091-22-316.

Список литературы

1. Erkinen M.G., Kim M., Geschwind M.D. Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2018. Vol. 10.
2. Book A. et al. Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic *Streptomyces* through selection of expanded gene content and coordinated gene expression // PLOS biology. 2016. Vol. 14. № 6. P. 1–21.
3. Gao B., Gupta R.S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria // Microbiology and molecular biology reviews. 2012. Vol. 76. № 1. P. 66–112.
4. Heidari B., Mohammadipanah F. Isolation and identification of two alkaloid structures with radical scavenging activity from *Actinokineospora* sp. UTMC 968, a new promising source of alkaloid compounds // Molecular Biology Reports. 2018. Vol. 45. № 6. P. 2325–2332.

5. Lan J., Jiang D. Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice // Journal of neural transmission. 1997. Vol. 104. P. 469–481.

6. Chang K. et al. Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases // Clinica Chimica Acta. 2018. Vol. 485. P. 79–87.

7. Luengo-Fernandez R., Leal J., Gray A. UK research spend in 2008 and 2012: Comparing stroke, cancer, coronary heart disease and dementia // BMJ Open. 2015. Vol. 5.

8. Yasuda D. et al. Preparation and antioxidant/pro-oxidant activities of 3-monosubstituted 5-hydroxyoxindole derivatives // Journal of clinical biochemistry and nutrition. 2016. Vol. 59. № 3. P. 165–173.

9. Axenov-Gribanov D.V. et al. Actinobacteria possessing antimicrobial and antioxidant activities isolated from the pollen of scots pine (*Pinus sylvestris*) grown on the Baikal shore // Antonie van Leeuwenhoek. 2016. Vol. 109. № 10. P. 1307–1322.

УДК 620.266

**Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Мухаммадиева Г.Ф.,
Валова Я.В., Байгильдин С.С., Хуснутдинова Н.Ю.**
ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт
медицины труда и экологии человека»,
Уфа, Россия
ekudoyarov@gmail.com

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ХЛОРИДА КАДМИЯ НА ДНК ГЕПАТОЦИТОВ МЫШИ

В статье приводятся результаты оценки генотоксичности хлорида кадмия на культуре гепатоцитов мыши МН-22а. В результате проведенного исследования с помощью метода ДНК-«комет» обнаружен повышенный уровень разрывов ДНК от хлорида кадмия в концентрации 10 мкМ и цитотоксичность при концентрациях хлорида кадмия 50 и 250 мкМ.

Ключевые слова: кадмия хлорид, цитотоксичность, генотоксичность, печень, клеточная культура, ДНК-«комета».

**Kudoyarov E.R., Karimov D.D., Mukhammadieva G.F.,
Valova Y.V., Baygildin S.S., Khusnutdinova N.Y.**
*Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology,
Ufa, Russia*

EVALUATION OF THE EFFECT OF CADMIUM CHLORIDE ON THE DNA OF MOUSE HEPATOCYTES

The article presents the results of evaluation of the genotoxicity of cadmium chloride on a culture of mouse hepatocytes MH-22a. As a result of the study using the DNA "comet" method, an increased level of DNA breaks from cadmium chloride at a concentration of 10 μM and cytotoxicity at concentrations of cadmium chloride of 50 and 250 μM were found.

Keywords: *cadmium chloride, cytotoxicity, genotoxicity, liver, cell culture, DNA-«comet».*

Хлорид кадмия относится к химическим веществам с высокой токсичностью, что делает возможным его применение для создания специальных условий моделирования механизмов токсикогенеза тяжелых металлов. Исследуемая субстанция состоит из бесцветных кристаллов без запаха и цвета, прекрасно растворяющихся в воде. В соответствии с действующими санитарными правилами и нормами СанПиН 1.2.3685-21 в воздухе рабочей зоны максимальная разовая предельно-допустимая концентрация (далее, ПДК) кадмия и его неорганических солей равна 0,05 мг/м³, среднесменная ПДК равна 0,01 мг/м³ [1].

Настоящее исследование было проведено для определения верхней границы диапазона концентраций хлорида кадмия, которые приводят к образованию *in vitro* разрывов ДНК культивируемых клеток млекопитающих МН-22а (гепатоциты мыши). Исследовательская работа выполнена для выполнения задач по теме научных исследований для экспериментального подтверждения маркеров воздействия тяжелых металлов на клетки организма.

Для выполнения эксперимента была использована культура гепатоцитов мыши МН-22а. С целью обработки исследуемым веществом культура МН-22а была выращена в стерильных полистирольных чашках Петри для адгезивных культур. Время экспозиции культуры хлоридом кадмия составило 24 часа. Было выбрано 3 концентрации хлорида кадмия (10, 50 и 250 мкм).

Кроме подопытных групп, были сформированы группы контролей: негативный контроль — добавление питательной среды без исследуемого соединения, позитивный контроль — добавление питательной среды исследуемого соединения, и дальнейшей обработкой перекисью

водорода (250 мкМ) в течение 20 минут перед заключением в агарозный гель. Экспозиция каждой группы была выполнена двукратно.

Исследование образования разрывов ДНК выполнено с помощью метода электрофореза одиночных клеток (ДНК-«комет»). Процедура получения и анализа микропрепаратов ДНК-«комет» выполнена в соответствии с описанной ранее методикой [2, 3].

В группе негативного контроля было проанализировано 410 «комет», в группе позитивного контроля — 441 «комета». При концентрациях хлорида кадмия 10, 50 и 250 мкМ — было проанализировано 472, 24 и 13 «комет». Доля «комет» с повреждениями ДНК равна в группе негативного контроля — 0,24%, в группе позитивного контроля — 36,82%, в группах, затравленных хлоридом кадмия в концентрациях 10, 50 и 250 мкМ — 80,95%, 100% и 100%, соответственно.

Доля «комет-ежиков» в группе негативного контроля составила 0,20% «комет», в группе позитивного контроля — 1,07%, в группах, затравленных хлоридом кадмия в концентрациях 10, 50 и 250 мкМ — 2,49%, 18,55% и 0%, соответственно. «Кометы-призраки» в группах контролей не обнаружены. Проценты «комет-призраков» в группах, затравленных хлоридом кадмия в концентрациях 10, 50 и 250 мкМ составили 9,96%, 79,17% и 100%.

По результатам однофакторного дисперсионного анализа Крускала–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения трех групп клеток (негативный контроль, позитивный контроль, опытная группа, затравленная 10 мкМ хлоридом кадмия) обнаружено статистически значимое различие ($p < 0,001$). В группе отрицательного контроля медианные значения получены следующие: процент ДНК в хвосте «кометы» составляет 0,03% (0,01–0,21%), длина хвоста «кометы» — 1,60 мкм (максимально до 2,69 мкм), момент хвоста — $4,9 \times 10^{-4}$ ($(1-40) \times 10^{-4}$), — что указывает на незначительное воздействие условий на ДНК исследуемых клеток. В группе позитивного контроля медианный процент ДНК в хвосте «кометы» составляет 3,44% (1,30–6,82%), длина хвоста «кометы» 5,4 мкм (3,24–9,72 мкм), момент хвоста 0,19 (0,04–0,67), — это показатель того, что процесс приготовления микропрепаратов ДНК-«комет» обладает чувствительностью к изменению целостной структуры ДНК.

В группе клеток, затравленных хлоридом кадмия (10 мкМ, 24 часа) медианный процент ДНК в хвосте «кометы» составляет 20,06% (11,29–30,38%), длина хвоста «кометы» — 33,21 мкм (22,14–43,20 мкм), момент хвоста — 6,35 (2,69–12,77), что указывает на генотоксичность хлорида кадмия в выбранной концентрации, которое по всем трем параметрам превышает соответствующие значения, полученные в груп-

пах позитивного и негативного контроля. В проведенном экспериментальном исследовании было продемонстрировано, что при концентрации 10 мкМ хлорид кадмия обладает генотоксичностью, а при концентрациях 50 и 250 мкМ проявляет цитотоксические свойства.

Список литературы

1. Санитарные правила и нормы СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания». Утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021. № 2.

2. Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Каримов Д.О., Репина Э.Ф., Бакиров А.Б., Данилко К.В. Оценка влияния индукции цитохрома P450 на генотоксичность тетрахлорметана *in vitro* // Медицина труда и промышленная экология. 2019. Т. 59. № 4. С. 206–211.

3. Методические рекомендации МР 4.2.0014–10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*». М. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.

УДК 615.916:661.862

**Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Зиатдинова М.М.,
Якупова Т.Г., Ахмадеев А.Р., Репина Э.Ф.**

*ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт
медицины труда и экологии человека»,
Уфа, Россия
ekudoyarov@gmail.com*

КЛЮЧЕВЫЕ ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ АЛЮМИНИЯ У ЖИВОТНЫХ

В настоящей публикации анализируются особенности накопления и перемещения атомов алюминия у животных в связи с особенностями их локализации в организме, распределения непосредственно в органоидах клеток и проявлениями токсических свойств.

Ключевые слова: соединения алюминия, токсикокинетика, токсикодинамика, окислительный стресс.

**Kudoyarov E.R., Karimov D.D., Ziatdinova M.M.,
Yakupova T.G., Akhmadeev A.R., Repina E.F.**

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology

Ufa, Russia

ekudoyarov@gmail.com

KEY FEATURES OF ALUMINUM ACCUMULATION IN ANIMALS

The features of the accumulation and movement of aluminum atoms in animals in connection with the peculiarities of their localization in the body is analyzed in this publication including distribution directly in cell organelles and manifestations of toxic properties.

Keywords: *aluminum compounds, toxicokinetics, toxicodynamics, oxidative stress.*

Трансферрин, являясь основным транспортным белком для ионов железа, выполняет аналогичную функцию по отношению к ионам алюминия в организме животных путем образования с ними химических комплексов. Например, у грызунов доля алюминия, связанного с протеинами жидкой фазы крови равна около 95% при среднем содержании алюминия 6 мг/л [1]. Также у грызунов была показана возможность белков плазмы крови связывать ионы алюминия до 98% даже при концентрациях более 100 мг/л. Однако после инъекций хлористого алюминия кроликам его значительная часть выводится из организма путем экскреции с мочой, но при высоких концентрациях наблюдается поражение почек [2].

В цитоплазматическом содержимом клеток алюминий связан в основном с остатками ортофосфорной кислоты, входящими в состав молекул аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и фосфорилированных аминокислот [3]. Более 30 лет назад было показано наличие различий в проявлении токсических свойств алюминия как между отдельными видами животных, так и между различными органоидами, клетками и тканями на уровне организма [3]. Например, в нейтральной питательной среде на монослое из гепатоцитов крыс продемонстрирована кумуляция атомов алюминия в ядрах клеток, при низком содержании его в митохондриях и других органеллах [2]. Однако гепатоциты в печени крыс в основном накапливали алюминий в митохондриях и описанные факты не зависели от вида химического соединения алюминия [3]. В следующем научном исследовании описывается, что на протяжении 50 дней алюминий и фосфат выборочно кумулируются в лизосомах гепатоцитов после введения в вену хлористого алюминия у поросят, что исследуемое соединение было обнаружено не в каждой органелле и

даже не в каждом гепатоците [2]. Аналогично алюминий кумулируется в почках крыс при интерстициальном введении хлористого алюминия [2]. Подобный характер хаотичного накопления алюминия-26 наблюдался в ядрах клеточной культуры Сасо-2 независимо от вида соединения, добавляемого в среду [2].

При добавлении хлористого алюминия в слабокислую питательную среду с культурой нейробластомы *M. musculus* отмечено накопление алюминия в органеллах следующим образом: до 20% локализовано в ядрах и клеточном дебрисе, около 70% в канальцах эндоплазматической сети, лизосомах и цитопазме, более 10% в митохондриях [4]. На культуре клеток нейробластомы *H. sapiens* показано равное распределение алюминия в цитоплазме и ядре, после добавления в питательную среду комплексоната алюминия [4]. Значительное количество алюминия в ядре связывается с белками, и в меньшей степени исследователям удавалось обнаружить соединение алюминия с ДНК [4]. В то же время при внесении соединений алюминия в состав питательного раствора в переживающих срезах мозжечка крыс атомы алюминия обнаруживались лишь в лизосомах [4]. Исследование проникновения изотопа алюминия-26 (в виде комплексоната алюминия) в клетки нейробластомы человека *in vitro* продемонстрировало, что 55% алюминия входит в ядерную фракцию, а остальная часть концентрируется в цитоплазме. Более 80% алюминия в ядре находится в подвижной фазе, в то время как ковалентно связано с белками лишь около 16% алюминия, а с нуклеиновыми кислотами — менее 2% [4].

Имеются научные доказательства того, что органические соединения алюминия значительно отличаются по кинетическим свойствам. Так, мальтолат алюминия накапливается внутри нервных клеток [4]. Концентрирование алюминия в форме везикул в нейроноподобных клетках обнаружено после добавления в питательную среду хлористого, молочнокислого или фтористого алюминия [4]. Лимоннокислый алюминий соединяется с транспортером монокарбоксилата и служит основным источником алюминия в спинномозговой жидкости [2, 4].

Обсуждение того, какая структура является «мишенью» алюминия в клетке не прекращено до сих пор так же, как и исследователей волнует вопрос о механизме развития токсического повреждения под действием окислительных реакций. Значительная часть исследователей убеждена в том, что основным токсическим эффектом алюминия является нарушение физико-химических свойств мембран клетки вследствие окисления молекул, входящих в их состав [5]. Не менее волнующей темой исследований остается уточнение последовательности ре-

акций, вызывающего генез окислительного стресса, между атомами алюминия и соединениями в организме.

Таким образом, токсикокинетические и токсикодинамические свойства соединений алюминия при поступлении в организм животных остаются актуальными для исследования и выявляют необходимость в поиске новых научных методов и способов проведения исследований механизмов токсического и потенциального биологического действия алюминия.

Список литературы

1. Burnatowska-Hledin M.A., Mayor G.H., Lau K. Renal handling of aluminum in the rat: clearance and micropuncture studies // American Physiological Society Journal. 1985. Vol. 249. P. F192-F197.

2. Yokel R.A., McNamara P.J. Aluminum toxicokinetics: an updated minireview // BMC Pharmacology and Toxicology. 2001. Vol. 88. P. 159–167.

3. Krewski D., Yokel R.A., Nieboer E. et al. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide // Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B: Critical Reviews. 2007. Vol. 10 (Suppl 1). P. 1–269.

4. Crisponi G., Nurchi V.M., Bertolasi V. et al. Chelating agents for human disease related to aluminium overload // Coordination Chemistry Reviews. 2012. Vol. 256. P. 89–104.

5. Exley C. The pro-oxidant activity of aluminium // Free Radical Biology and Medicine. 2004. Vol. 36. P. 380–387.

УДК 576.385: 616.36-004

Лебедева Е.И.¹, Бабенко А.С.², Щастный А.Т.¹

*¹Витебский государственный медицинский университет,
Витебск, Республика Беларусь*

*²Белорусский государственный медицинский университет,
Минск, Республика Беларусь*

lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У КРЫС W1STAR ИНДУЦИРОВАННОГО ТИОАЦЕТАМИДОМ

Фиброз печени у крыс-самцов Wistar индуцировали тиоацетамидом в течение 11 недель. Морфологическое исследование печени проводили на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, методом Маллори. При планировании эксперимента по индукции фиброза печени у крыс-самцов Wistar тиоацетамидом необходимо учитывать следующие рекомендации: использовать не менее 10–15

животных в каждой экспериментальной группе; не исключать из анализа данные, выбивающиеся из обще групповых показателей; учитывать максимально возможное количество факторов способных повлиять на результаты моделирования фиброза и формирование индивидуальных реакций животных на экспериментальные условия.

Ключевые слова: крысы Wistar, тиоацетамид, фиброгенез печени, индивидуальные особенности.

Lebedeva E.I.¹, Babenka A.S.², Shchastniy A.T.¹

¹Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

²Belarussian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

FEATURES OF THE DEVELOPMENT OF LIVER FIBROSIS IN WISTAR RATS INDUCED BY THIOACETAMIDE

Liver fibrosis in male Wistar rats was induced with thioacetamide for 11 weeks. Morphological examination of the liver was performed on paraffin sections stained with hematoxylin and eosin using the Mallory method. When planning an experiment on the induction of liver fibrosis in male Wistar rats with thioacetamide, the following recommendations should be taken into account: use at least 10–15 animals in each experimental group; do not exclude outliers from the analysis; take into account the maximum possible number of factors that can affect the results of modeling fibrosis and the formation of individual reactions of animals to experimental conditions.

Keywords: Wistar rats, thioacetamide, liver fibrogenesis, individual characteristics.

Введение. Тиоацетамид (ТАА) является селективным гепатотоксичным известным с 1948 г. При этом лишь через 40 лет хроническая интоксикация грызунов ТАА была признана надежной и воспроизводимой экспериментальной моделью фиброза и цирроза печени [1, 2]. В печени ТАА окисляется до ацетамида, он в свою очередь превращается в тиоацетамид-S-оксид. Тиоацетамид-S-оксид связывается с макромолекулами, которые отвечают за изменение проницаемости клеточной мембраны и поглощение ионов кальция. Это увеличивает объем ядер и ядрышек, снижает активность митохондрий и вызывает некроз [3]. Эти процессы сопровождаются изменением конформации белков, липидов и нарастанием количества свободнорадикальных процессов. Механизмы с помощью, которых ТАА вызывает повреждение печени, весьма сложен и далек от полного понимания [2, 4].

Анализ научной литературы показал, что при моделировании фиброза и цирроза печени тиоацетамидом исследователи в своих работах используют различные линии крыс (Sprague-Dawley, Wistar, F344) и мышей (C57BL/6, Kunming special), способы введения, дозы и кратность. Применяют ТАА как единственный гепатотоксин, а также в сочетании с четыреххлористым углеродом или этанолом, или фенобарбиталом или перевязкой желчных протоков. Одни ученые используют пероральный способ введения с фиксированной дозой путем добавления 300 мг/л ТАА к питьевой воде или корму, другие — переменную дозу в зависимости от веса животного. Применяют внутрибрюшинное введение ТАА в дозах 10–400 мг/кг 2–3 раза в неделю в течение от 3 до 20 недель [5–8].

К сожалению, в этих исследованиях не сообщается ни о части экспериментальных животных, у которых развился выраженный фиброз или цирроз печени, ни о показателях смертности. При использовании перорального способа введения ТАА путем добавления к питьевой воде или корму существует проблема низкой воспроизводимости морфологических проявлений фиброза и цирроза и длительность эксперимента [2, 6–9].

На основании опубликованных работ экспериментатору часто трудно сделать правильный выбор в пользу той или иной модели, количества животных в группах и даже критериев оценки эффекта индуктора фиброза на изучаемые процессы. В данной работе мы поставили перед собой цель провести анализ последствий воздействия тиоацетамида на печень крыс линии Wistar с учетом индивидуальных реакций животных внутри каждой экспериментальной группы. Мы считаем, что более подробный анализ данных может помочь выявить новые, до сих пор не выявленные особенности развития фиброза в экспериментальных условиях, а также подчеркнуть некоторые эффекты, недополучающие должного внимания из-за усреднения результатов в моделях.

Материал и методы исследования. В эксперименте использовали половозрелых крыс-самцов Wistar массой от 190–210 г. Протокол исследования был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019 г.). Фиброз и цирроз печени у животных вызывали раствором ТАА, который вводили в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного 2 раза в неделю за 3 ч до кормления в течение 11 нед. Животных рандомизировали на 6 групп по 12 особей в каждой. Для исследования фиб-

рогенеза в динамике опытных крыс выводили из эксперимента через 3, 5, 7, 9, 11 недель, а интактных — по окончании эксперимента. Гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, по методу Маллори изучали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard на базе микроскопа OLYMPUS BX51. Результаты исследования обрабатывали с использованием программ Statistica 10.0 фирмы StatSoft, IBM SPSS Statistics 23.0, Microsoft Office Excel. Проведение эксперимента, гистологическое исследование образцов печени и статистическая обработка данных подробно описаны в статье [10].

Результаты и их обсуждение. В течение 3 недель эксперимента погибло 2 животных. Патологоанатомическое вскрытие показало, что печень была увеличена в размерах, мягкая и рыхлая на ощупь с гладкой поверхностью, на ее красно-коричневом фоне были видны множественные участки бело-серого цвета. Морфологически фиброз не верифицировали. С 7-й по 9-й недели пало одно животное. При вскрытии печень была увеличена в размерах, буро-серого цвета, в отдельных участках на ее поверхности наблюдали твердые милиарные образования серо-желтого цвета. Гистологически выявили цирроз печени. С 9-й по 11-ю погибло 2 крысы. При вскрытии печень была увеличена в размерах, имела грубозернистую неровную поверхность серого цвета, местами резко выраженные обширные, местами тотальные участки цирроза.

Структура печени интактных крыс Wistar соответствовала критериям нормы. Степень фиброза по шкале K.G. Ishak. соответствовала F0.

На раннем сроке эксперимента (3 недели) у 80% крыс верифицирован портальный фиброз печени со степенью F1 (рис. 1А). В гистологическом препарате одновременно наблюдали вокруг одних портальных зон разрастание соединительной ткани без соединительнотканых септ, вокруг других — с неполными соединительноткаными септами. Мостовидный фиброз не отмечали. У 20% животных степень фиброза по шкале K.G. Ishak соответствовала F3 (рис. 1Б). В печени выявили портальный, мостовидный, местами центрлобулярный и диффузный перипеллюлярный фиброз.

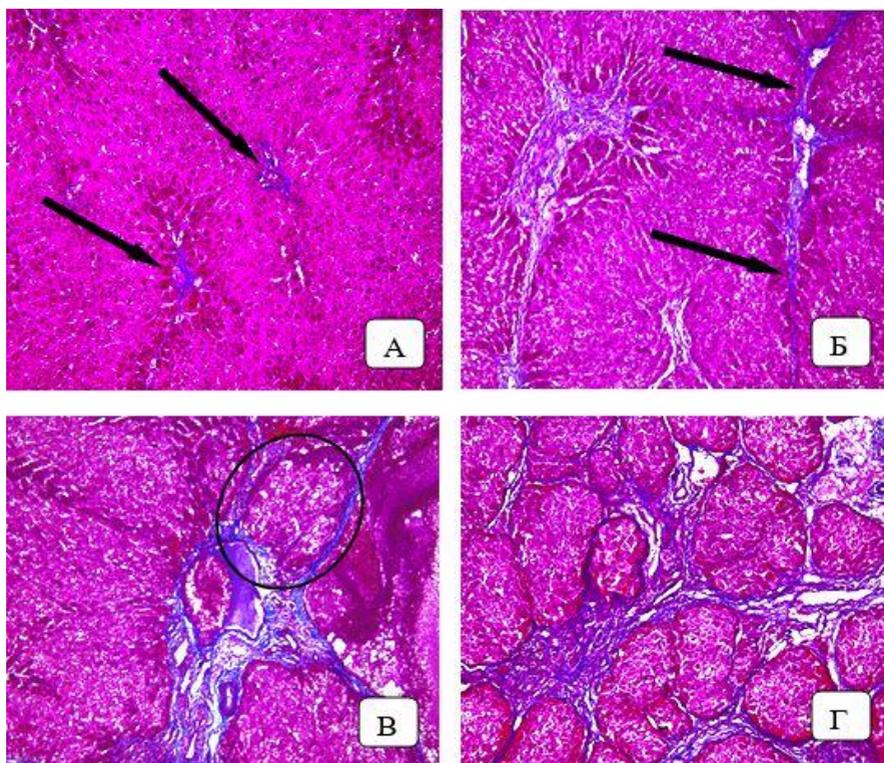


Рис. 1. Фрагменты печени крыс. Окраска по методу Маллори, ув. об. $\times 20$

А — печень крысы с индуцированным фиброзом через 3 недели после начала эксперимента, незначительное количество соединительной ткани вокруг сосудов отмечено стрелками;

Б — печень крысы с индуцированным фиброзом через 3 недели после начала эксперимента, соединительнотканые септы между портальными зонами (мостовидный фиброз) отмечены стрелками;

В — печень крысы с индуцированным циррозом через 9 недель после начала эксперимента, сформированная ложная печеночная долька выделена рамкой овальной формы;

Г — печень крысы с индуцированным циррозом через 9 недель после начала эксперимента, четко визуализируются сформированные ложные печеночные дольки.

По истечении 7 недель у 80% крыс патологоанатомически и морфологически наблюдали признаки, выявленные у 20% животных на предыдущем сроке эксперимента (3 недели). При этом у 20% крыс отметили максимально выраженное фиброзное расширение всех портальных зон, многочисленные порто-портальные соединительнотканые септы разной толщины, формирующие ложные печеночные дольки рядом с портальными зонами и в паренхиме органа (неполный цирроз со степенью фиброза равной F5).

При дальнейшей интоксикации крыс (9 недели) у 80% животных в гистологических препаратах местами около портальных зон наблюдали единичные сформированные ложные печеночные дольки — начало процесса трансформация фиброза печени в цирроз (рис. 1В). Степень фиброза была раной F4/F5. У 20% крыс выявлен достоверный цирроз печени (рис. 1Г).

Последующие исследования показали, что через 11 недель эксперимента в гистологических препаратах 80% животных установили диффузную перестройку паренхимы органа с формированием ложных печеночных долек, степень фиброза соответствовала F5 — неполный цирроз. Из них у 20% крыс установлено значительное разрастание соединительной ткани вокруг портальных зон и формирование толстых септ по периферии ложных печеночных долек. У 20% крыс выявлен цирроз печени. У этой части животных патологоанатомические и морфологические критерии фиброза и цирроза печени развивались на 4 недели раньше.

Особенно следует отметить, что при изучении гистологических препаратов выявлены различия в выраженности фиброза и цирроза печени у всех животных. До стадии трансформации фиброза в цирроз наряду с увеличением количества пораженных долек в гистологических препаратах оставалось достаточное количество непораженных участков, а на стадиях цирроза различная его выраженность. Это указывает на нелинейность протекающих патологических изменений.

Несмотря на то, что формально у всех животных отмечались схожие реакции на воздействие тиаоцетамида, часть из них отвечала значимо раньше. Соответственно включение таких животных в анализ требует их рассмотрения отдельно от общей группы. Очевидно, что на развитие патологических процессов в печени оказывают влияние индивидуальные особенности крыс, однако предсказать такие эффекты до начала эксперимента на сегодняшний день кажется невозможным или по крайней мере экономически неоправданным действием.

Выводы. При планировании эксперимента по индукции фиброза печени у крыс тиаоцетамидом мы рекомендуем: использовать не менее

10–15 животных в каждой экспериментальной группе; не исключать из анализа данные, выбивающиеся из обще групповых показателей; учитывать максимально возможное количество факторов способных повлиять на результаты моделирования фиброза и формирование индивидуальных реакций животных на экспериментальные условия. Мы считаем, что полученные нами результаты помогут получить исследователям больше новых данных, повысят их точность и воспроизводимость.

Список литературы

1. Yanguas S.C., Cogliati B., Willebrords J., Maes M., Colle I., van den Bossche B., de Oliveira C.P.M.S., Andraus W., Alves V.A.F., Leclercq I., Vinken M. Experimental models of liver fibrosis // *Archives of Toxicology*. 2016. № 90(5). P. 1025–1048. doi: 10.1007/s00204-015-1543-4.

2. Wallace M.C., Hamesch K., Lunova M., Kim Y., Weiskirchen R., Strnad P., Friedman S.L. Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats // *Lab Animal*. 2015. № 49(1 Suppl.). P. 21–29. doi: 10.1177/0023677215573040.

3. Zargar S., Wani T.A., Alamro A.A., Ganaie M.A. Amelioration of thioacetamide-induced liver toxicity in Wistar rats by rutin // *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2017. № 30(3). P. 207–214. doi: 10.1177/0394632017714175.

4. Muthiah M.D., Huang D.Q., Zhou L., Jumat N.H., Choolani M., Chan J.K.Y., Wee A., Lim S.G., Dan Y.Y. A murine model demonstrating reversal of structural and functional correlates of cirrhosis with progenitor cell transplantation // *Scientific Reports*. 2019. № 9. 15446. doi: 10.1038/s41598-019-51189-7.

5. Salguero Palacios R., Roderfeld M., Hemmann S., Rath T., Atanasova S., Tschuschner A., Gressner O.A., Weiskirchen R., Graf J., Roeb E. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice // *Lab Invest*. 2008. № 88(11). P. 1192–1203. doi: 10.1038/labinvest.2008.91.

6. Dweep H., Morikawa Y., Gong B., Yan J., Liu Z., Chen T., Bisgin H., Zou W., Hong H., Shi T., Gong P., Castro C., Uehara T., Wang Y., Tong W. Mechanistic roles of microRNAs in hepatocarcinogenesis: A study of thioacetamide with multiple doses and time-points of rats // *Scientific Reports*. 2017. № 7(1). P. 30–54. doi: 10.1038/s41598-017-02798-7.

7. Zaldivar M.M., Pauels K., von Hundelshausen P., Berres M.L., Schmitz P., Bornemann J., Kowalska M.A., Gassler N., Streetz K.L., Weiskirchen R., Trautwein C., Weber C., Wasmuth H.E. CXC chemokine ligand 4 (Cxcl4) is a platelet-derived mediator of experimental liver fibrosis // *Hepatology*. 2010. № 51(4). P. 1345–53. doi: 10.1002/hep.23435.

8. Hajovsky H., Hu G., Koen Y., Sarma D., Cui W., Moore D.S., Staudinger J.L., Hanzlik R.P. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes // Chemical Research in Toxicology. 2012. № 25(9). P. 1955–1963. doi: 10.1021/tx3002719.

9. Denucci S.M., Tong M., Longato L., Lawton M., Setshedi M., Carlson R.I., Wands J.R., de la Monte S.M. Rat strain differences in susceptibility to alcohol-induced chronic liver injury and hepatic insulin resistance // Gastroenterology Research and Practice. 2010. P. 312–790. doi: 10.1155/2010/312790.

10. Лебедева Е.И., Щастный А.Т., Красочко П.А., Бабенко А.С. Новый подход к морфологической оценке степени фиброза печени у экспериментальных животных // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины. 2022. Т. 58. Вып. 1. С. 92–100.

УДК 612.79+577.112.854

Лопарева Д.Д., Чайка Н.А.

*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет» Минздрава России,*

Санкт-Петербург, Россия

loparevadasha@gmail.com, nadchajka@yandex.ru

СТАРЕНИЕ КОЖИ И МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ

В механизмах, запускающих старение кожи, важная роль отводится матричным металлопротеиназам. Именно они участвуют в деградации основных белков кожи, белков внеклеточного матрикса и тем самым приводят к увяданию кожи. Для создания эффективных способов замедления старения кожи необходимо научиться воздействовать на его основные патогенетические звенья и тем самым отсрочить этот процесс.

Ключевые слова: *матричные металлопротеиназы, их ингибиторы, старение кожи, активные формы кислорода.*

Lopareva D.D., Chajka N.A.

*Federal State budgetary Educational Institution of Higher Education
«St. Petersburg State Pediatric Medical University» of the Ministry of
Healthcare of the Russian Federation*

St. Petersburg, Russia

E-mail: loparevadasha@gmail.com, nadchajka@yandex.ru

SKIN AGING AND MATRIX METALLOPROTEINASES

Matrix metalloproteinases play an important role in the mechanisms triggering skin aging. It is they who are involved in the degradation of the main proteins of the skin, extracellular matrix proteins and thereby lead to skin aging. To create effective ways to slow down skin aging, it is necessary to learn how to influence its main pathogenetic links and thereby delay this process.

Keywords: *matrix metalloproteinases and their inhibitors skin aging, reactive oxygen species, active forms of oxygen.*

Во все времена люди пытались бороться со старением кожи, чтобы сохранить дольше ее молодость и красоту. Старение кожи и кожи лица в частности, является частью общего биологического процесса старения и определяется теми же законами. Сейчас хорошо известно, что инволюционные изменения в коже характеризуются возрастной этапностью проявления старения. Это признаки хроно- и фотостарения. Хронологическое старение в коже связано со снижением активности и старением фибробластов, вследствие снижения уровня эстрогенов в организме, что сопровождается нарушением синтеза коллагена и других белков внеклеточного матрикса. Фотостарение кожи развивается при длительном воздействии ультрафиолетового излучения (УФ-излучения) длинноволнового спектра, что приводит к образованию активных форм кислорода (АФК), способствующих изменениям в структуре всех транскриптов, синтезируемых фибробластами, в том числе транскриптов матриксных металлопротеиназ (ММП). Именно они участвуют в механизмах, запускающих хроно- и фотостарение кожи, влияя на структуры внеклеточного матрикса (ВКМ) [1, 2]. Для разработки эффективных способов замедления старения необходимо лучше понимать механизмы, задействованные в этих процессах, и научиться воздействовать на основные патогенетические звенья старения. В настоящее время ведутся разработки препаратов, способных влиять на активность ММП и тем самым замедлять процессы старения.

Матриксные металлопротеиназы — это обширное семейство кальций и (или) цинк-зависимых эндопептидаз. Они участвуют в обмене

компонентов внеклеточного матрикса — коллагена, эластина, гликопротеинов и протеогликанов (фибронектина, гликозаминогликанов). ММП синтезируются и секретируются фибробластами, макрофагами, эпителиальными, гладкомышечными клетками сосудов и другими. ММП, как правило, секретируются в виде неактивной формы — про-ММП, которые превращаются в активную форму различными ферментами, включая другие ММП [3].

В структуре этих ферментов выделяют: сигнальный пептид, пропептидный участок, каталитический домен, линкерный пептид или шарнирная область и гемопексиноподобный домен [3, 4]. Сигнальный пептид необходим для успешной секреции фермента из клетки — при его удалении пре-про-ММП, синтезируемая в клетке, переходит в про-ММП. Пропептидный участок содержит консервативную последовательность PRCGXPД, получившую название «цистеиновый выключатель», поскольку содержит SH-группу, которая, связываясь с атомом Zn^{2+} в активном центре, поддерживает молекулу ММП в форме предшественника. После гидролитического удаления пропептида и освобождения цинк-связывающего центра происходит активация ММП. Каталитический домен содержит два или три иона Ca^{2+} для стабилизации активного центра и соединен координационными связями с ионом Zn^{2+} . Линкерный пептид имеет переменную длину и способен связывать каталитический домен с гемопексиноподобным доменом. Замыкающий участок — гемопексиноподобный домен. Он содержит центр связывания с субстратом, благодаря чему происходит его гидролиз.

В настоящее время известно 30 типов ММП, которые объединены в пять основных подгрупп в зависимости от структурной организации и субстратной специфичности: коллагеназы, стромелизины, матрилизины, желатиназы и мембранно-связанные ММП, которые имеют дополнительный С-концевой трансмембранный домен. Коллагеназы распознают субстрат через гемопексиноподобный домен и способны разрушать фибриллы коллагена. Стромелизины по строению похожи на коллагеназы, но не способны расщеплять коллаген I типа. В структуре матрилизинов отсутствует гемопексиноподобный домен и гидролиз коллаген I типа не возможен. Желатиназы способны расщеплять коллаген IV типа и неколлагеновые белки — ламинин, фибронектин, витронектин. ММП мембранного типа имеют дополнительный С-концевой трансмембранный домен и также расщепляют коллаген I типа. Существует также особая подгруппа ММП — ММП-12, известная также как металлоэластаза макрофагов, разрушающая эластин [3, 5].

Одним из этиологических факторов, вызывающих старение кожи, является УФ-излучение. Оно способствует выбросу цитокинов, таких как IL-1 α , IL-6, TNF α , образованию АФК, влияющих на экспрессию ММП — MMP-1, MMP-3, или MMP-9, т.е. ферментов, разрушающих коллаген и эластиновые волокна. АФК стимулируют передачу сигнала митоген-активируемой протеинкиназе, которая индуцирует факторы транскрипции, такие как активаторный белок-1 (АБ-1) и нуклеарный фактор-кВ (NF-кВ) [1, 2]. Эти факторы в свою очередь подавляют передачу сигналов трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) и увеличивают экспрессию ММП. Среди них есть, например, ММП-1, 3 и 9, разрушающие непосредственно фибриллы коллагена I, III и IV типа. Сначала они раскручивают тройную спираль коллагена и затем участвуют в гидролизе пептидных связи фибрилл коллагена на фрагменты. Также увеличивается экспрессия ММП-12, которая, как было уже сказано, участвует в деградации эластина, и происходит ингибирование синтеза проколлагена, осуществляемое АБ-1. В результате происходит уменьшение количества функционально-активных эластических волокон, накапливается патологически измененный эластин, появляются морщины, т.е. возникает актинический (солнечный) эластоз. Старые фибробласты образуют большее количество АФК, что дополнительно увеличивает экспрессию ММП и ингибируют передачу сигналов TGF- β . Вышеперечисленные процессы происходят именно под действием длинноволнового спектра УФ-излучения (320–400 нм) типа А (УФА): из всего спектра УФ-излучения только тип А проникает в глубокие слои кожи и провоцирует образование АФК.

Согласно литературным данным [4, 6] ММП теряют активность под действием как эндогенных, так и экзогенных ингибиторов. Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (ТИМП) представляют собой эндогенные ингибиторы ММП. Они имеют N-концевой домен и C-концевой домен, каждый из которых содержит 3 дисульфидные связи. Молекула ТИМП присоединяется к активному центру ММП так же, как и субстрат. Было выделено четыре гомологичных вида ТИМП: ТИМП-1 и ТИМП-3 являются гликопротеинами, тогда как ТИМП-2 и ТИМП-4 не содержат углеводов. ТИМП широко распространены во многих тканях и органах. Изменение содержания ММП или ТИМП может способно изменить активность протеиназ в ту или иную сторону. Ингибирование ММП с помощью ТИМП уменьшило бы деградацию белков ВКМ, однако эндогенные ТИМП не очень специфичны и часто ингибируют несколько ММП, что часто вызывает побочные эффекты со стороны опорно-двигательного аппарата — воспаление суставов, боли, скованность. Другим эндогенным ингибитором ММП яв-

ляется $\alpha 2$ -макроглобулин. Это собственно гликопротеин, который состоит из четырех субъединиц и выполняет роль ингибитора протеиназы широкого спектра действия. $\alpha 2$ -макроглобулин взаимодействует с ММП, а затем ММП расщепляется и удаляется путем эндоцитоза через АБ-1, который похож на рецептор липопротеинов низкой плотности.

Несмотря на наличие в организме эндогенных ингибиторов, в настоящее время достаточно широко используются ретиноловые пилинги в сочетании с наружной терапией ретинолом, ведется разработка препаратов, которые блокируют экспрессию ММП или их действие на ВКМ. Наибольшей эффективностью обладают препараты Адапален, Бексаротен, Третиноин и Тазаротен, которые являются ретиноидами (производными витамина А) [7, 8]. Их местное применение ингибирует АБ-1, подавляет экспрессию ММП и, тем самым, предотвращается деградация коллагена и эластина. Также ретиноиды, действуя через рецепторы ретиноевой кислоты и ретиноидные X-рецепторы, увеличивают количество проколлагена I типа, предшественника коллагена I типа. Другой способ предотвратить повреждающее действие УФ-излучения — это использовать антиоксиданты. Антиоксиданты повышают устойчивость к действию окислительного стресса, тем самым замедляя процесс старения кожи. Среди них широко используется аскорбиновая кислота (витамин С), которая является кофактором пролин и лизингидроксилазы, необходимой для синтеза проколлагена и проэластина. Помимо аскорбиновой кислоты, в клинике применяются гликолевая, молочная кислоты. Они стимулируют выработку компонентов ВКМ в концентрации от 5% до 25%. В последнее время большим интересом пользуются пептиды: они запускают и регулируют определенные механизмы производства ВКМ, так как небольшой размер позволяет им проникать в верхние слои кожи. В последних испытаниях была показана их клиническая эффективность. Также сейчас предпринимается попытка по созданию антител для ингибирования ММП [9]. Уникальность ингибирующих антител заключается в минимальной токсичности, так как при их деградации образуются пептиды и аминокислоты, обладают высокой селективностью к ММП. Эти их свойства имеют большие перспективы в качестве терапевтических средств для предотвращения преждевременного старения кожи.

Таким образом, признаки старения кожи усиливаются из-за внутренних и внешних факторов, приводящих к хроно- и фотостарению. Одним из важных внешних факторов служит длинноволновое УФ-излучение. Именно оно, через АФК увеличивает экспрессию ММП и, тем самым, деградацию ВКМ. Существующие методы не приводят к успеху из-за побочных эффектов или отсутствия ожидаемого результа-

та, а позволяют только замедлить процесс старение кожи. Это способствует разработке и созданию препаратов нового поколения, которые блокируют экспрессию ММП, не обладают токсическим действием и приостанавливают старение кожи.

Список литературы

1. Shin, Jung-Won et al. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches // International journal of molecular sciences. 2019. Vol. 20(9). P. 2126. <https://doi.org/10.3390/ijms20092126>.

2. Gromkowska-Керка, Krystyna Joanna et al. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging — review of *in vitro* studies // Journal of cosmetic dermatology. 2021. Vol. 20(11). P. 3427–3431. <https://doi.org/10.1111/jocd.14033>.

3. Cui, Ning et al. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases : Progress in molecular biology and translational science. 2017. Vol. 147. P. 1–73. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>.

4. Wang X, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease // Adv Pharmacology. 2018. Vol. 81. P. 241–330. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>.

5. Тихаева К.Ю., Рогова Л.Н., Ткаченко Л.В. Роль металлопротеиназ в обмене белков внеклеточного матрикса эндометрия в норме и при патологии // Проблемы репродукции. 2020. № 26(4). С. 22–29. <https://doi.org/10.17116/repro20202604122>.

6. Cabral-Pacheco, Griselda A. et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases // International journal of molecular sciences. 2020. Vol. 21 (24). P. 9739. <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>.

7. Вавилова А.А., Губанова Е.И., Закирова Г.Ш. Изучение эффективности терапии ретиноидами, скинбустерами и филлерами у пациентов с хроно- и фотостарением лица // Клиническая дерматология и венерология. 2019. № 18 (2). С. 218–224. <https://doi.org/10.17116/klinderma201918021218>.

8. Королькова Т.Н., Шепилова И.А., Калмыкова Н.В. Влияние химических пилингов с ретиноидами на иммуногистохимические параметры кожи // Клиническая дерматология и венерология. 2019. № 8(2). С. 210–216. <https://doi.org/10.17116/klinderma201918021210>.

9. Fischer T., Riedl R. Inhibitory Antibodies Designed for Matrix Metalloproteinase Modulation // Molecules. 2019. Vol. 24(12). P. 22–65. <https://doi.org/10.3390/molecules24122265>.

УДК 577.21:616.248

*Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В., Гизатуллина А.А.,
Каримов Д.О., Кудояров Р.Э., Кабирова Э.Ф.*

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»

Уфа, Россия

ufniimt@mail.ru

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОСЛОЖНЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Проведен анализ ассоциации полиморфного локуса rs1695 гена GSTP1 с риском развития осложнений бронхиальной астмы. Полученные данные дают основание предполагать, что носительство генотипа Ile/Ile полиморфного локуса rs1695 гена GSTP1 является протективным фактором в отношении развития осложнений среди пациентов с бронхиальной астмой, а носительство аллеля Val — маркером повышенного риска осложнений бронхиальной астмы.

Ключевые слова: *гены, полиморфизм, бронхиальная астма, риск, осложнения.*

*Mukhammadiyeva G.F., Valova Ya.V., Gizatullina A.A.,
Karimov D.O., Kudoyarov E.R., Kabirova E.F.*

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology,

Ufa, Russia

ufniimt@mail.ru

SEARCH FOR GENETIC POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF ASTHMA COMPLICATIONS

An analysis was made of the association of the rs1695 polymorphic locus of the GSTP1 gene with the risk of developing asthma complications. The obtained data suggest that the carriage of the Ile/Ile genotype of the rs1695 polymorphic locus of the GSTP1 gene is a protective factor in relation to the development of complications among patients with asthma, and the carriage of the Val allele is a marker of an increased risk of asthma complications.

Keywords: *genes, polymorphism, asthma, risk, complications.*

Бронхиальная астма (БА) — мультифакториальное заболевание, развитие которого определяется взаимодействием множества генов и факторов внешней среды, сочетанное влияние которых приводит к чрезвычайной гетерогенности в фенотипических проявлениях и тече-

нии заболевания. Гетерогенность БА может проявляться в разной степени тяжести, наличии осложнений, аллергических реакций и др.

Развитие астмы и связанных с ней фенотипов в значительной мере зависит от активности ферментов системы детоксикации ксенобиотиков [1]. К данной группе относится ген *GSTP1*, который является одним из наиболее важных генов-кандидатов БА. Полиморфизм в 5 экзоне (rs1695) гена *GSTP1* проявляется заменой изолейцина в 105 положении на валин (Ile105Val). Есть работы, в которых были выявлены значимые ассоциации полиморфного локуса rs1695 гена *GSTP1* с фенотипическими проявлениями БА. Обсуждается влияние изучаемого полиморфизма на тяжесть дыхательных нарушений, положительные кожные тесты, высокий уровень общего IgE и другие важные клинкопатогенетические особенности БА [2].

Цель исследования: оценить наличие ассоциации полиморфного локуса rs1695 гена *GSTP1* с риском развития осложнений БА.

Материалы и методы. В исследование были включены 164 пациента с диагнозом БА, проходивших лечение на базе отделения профессиональной аллергологии и иммунореабилитации клиники ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека». Все больные были разделены на две группы: пациенты с осложнениями (n=121) и без осложнений (n=43). Группы были сопоставимы по полу и возрасту.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием протеиназы К с последующей экстракцией фенол-хлороформом. Генотипирование проводили методом ПЦР с дальнейшим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Продукты амплификации визуализировали в ультрафиолетовом свете после электрофореза в 3%-м агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Частоты генотипа и аллеля сравнивали между группами с помощью с помощью теста хи-квадрат. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Для определения ассоциации полиморфизма *GSTP1* rs1695 с осложнениями БА были рассчитаны отношения шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI). Все статистические анализы проводились с использованием SPSS, версия 17 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного анализа распределения частот генотипов и аллелей исследуемого полиморфизма гена *GSTP1* установлены статистически значимые различия между группами больных БА с осложнениями и без осложнений. В выборке с осложнениями отмечается снижение частоты генотипа Ile/Ile (42,98%) по сравнению с группой пациентов с неосложненным течением заболевания (62,79%; $\chi^2=4,23$; $p=0,040$), что может указывать на протек-

тивное влияние этого генотипа (OR=0,45; 95% CI 0,22–1,91). Также у больных БА с осложнениями выявлено повышение частоты аллеля Val по сравнению с больными без осложнений (34,30% и 20,93% соответственно; $\chi^2=4,71$; $p=0,030$).

В нашем исследовании продемонстрировано, что рисковой значимостью в отношении предрасположенности к осложнениям у больных БА обладает аллель Val полиморфного локуса rs1695 гена *GSTP1*, а гомозиготный генотип Ile/Ile является протективным фактором, который может рассматриваться в качестве маркера благоприятного течения БА. Полученные результаты отличаются от данных ранее проведенных исследований других авторов, в которых показана защитная роль аллеля Val в отношении развития БА и дыхательной дисфункции [3–6]. Но они сопоставимы с данными, полученными при сравнении групп детей с различной степенью тяжести БА [7]. Так, носительство генотипа Val/Val оказалось связано с более тяжелым течением БА. По-видимому, полученные данные отражают особенности влияния полиморфного локуса rs1695 гена *GSTP1* на фенотипические проявления БА. Результаты позволяют предположить, что редкий аллель Val затрагивает функционирование гена, что в свою очередь направляет патогенез заболевания по пути развития осложненного и тяжелого течения.

Таким образом, изучение полиморфного локуса rs1695 гена *GSTP1* показало, что носительство аллеля Val повышает риск развития осложнений БА, а генотип Ile/Ile обладает протективным действием. Обнаруженные ассоциации полиморфного локуса rs1695 гена *GSTP1* с осложнениями БА подтверждают важную роль этого гена в патогенезе данного заболевания.

Список литературы

1. Polonikov A.V., Ivanov V.P., Solodilova M.A. Genetic variation of genes for xenobiotic-metabolizing enzymes and risk of bronchial asthma: the importance of gene-gene and gene-environment interactions for disease susceptibility // *Journal of Human Genetics*. 2009. Vol. 54. № 8. P. 440–449. doi:10.1038/jhg.2009.58.
2. Hwang B.F., Young L.H., Tsai C.H. et al. Fine particle, ozone exposure, and asthma/wheezing: effect modification by glutathione S-transferase P1 polymorphisms // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. № 1. P. e52715. doi:10.1371/journal.pone.0052715.
3. Fryer A.A., Bianco A., Hepple M. et al. Polymorphism at the glutathione S-transferase *GSTP1* locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma // *American Jour-*

nal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2000. Vol. 161. № 5. P. 1437–1442. doi: 10.1164/ajrccm.161.5.9903006.

4. Aynacioglu A.S., Nacak M., Filiz A. et al. Protective role of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Val105Val genotype in patients with bronchial asthma // The British Journal of Clinical Pharmacology. 2004. Vol. 57. № 2. P. 213–217. doi: 10.1046/j.1365-2125.2003.01975.

5. Hanene C., Jihene L., Jamel A. et al. Association of GST genes polymorphisms with asthma in Tunisian children // Mediators of Inflammation. 2007. Vol. 22. P. 19564. doi: 10.1155/2007/19564.

6. Al-Arifa N., Jahan N. Association of glutathione-S-transferase P1 (GSTP1) and group-specific component (GC) polymorphism with the risk of asthma in Pakistani population // Pakistan Journal of Zoology. 2016. Vol. 48. № 4. P. 937–942.

7. Ercan H., Birben E., Dizdar E.A. et al. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma // Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2006 Nov. № 118(5). P. 1097–1104. doi: 10.1016/j.jaci.2006.08.012.

УДК 577.218:616.36

**Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В., Каримов Д.О., Кудояров Э.Р.,
Тимашева Г.В., Хуснутдинова Н.Ю.**

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА КАСПАЗЫ-7 У КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АЛКОГОЛЯ

Проведена оценка изменения экспрессии гена Casp7 в печени крыс при воздействии алкоголя. В работе использованы белые аутбредные крысы-самцы. В условиях проведенного эксперимента воздействие алкоголя практически не влияло на экспрессию гена Casp7, вовлеченного в регуляцию апоптоза.

Ключевые слова: *алкоголь, поражение печени, экспрессия гена.*

**Mukhammadiyeva G.F., Valova Ya.V., Karimov D.O., Kudoyarov E.R.,
Timasheva G.V., Khusnutdinova N.Yu.**
*Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology,
Ufa, Russia
ufniimt@mail.ru*

STUDY OF CASPASE-7 GENE EXPRESSION IN RATS UNDER THE INFLUENCE OF ALCOHOL

Changes in the expression of the Casp7 gene in the liver of rats under the influence of alcohol were evaluated. White outbred male rats were used in the work. Under the conditions of the experiment, alcohol exposure had practically no effect on the expression of the Casp7 gene involved in the regulation of apoptosis.

Keywords: *alcohol, liver damage, gene expression.*

К ведущим этиологическим факторам поражения печени относят алкоголь, который совместно со своими метаболитами оказывает деструктивное действие, вызывая спектр патологических изменений печени. Происходит интенсивное образование активных форм кислорода и усиление процессов перекисного окисления липидов, приводящее к повреждению структуры клеточных мембран, нарушение белкового, липидного и углеводного обмена, некроз и апоптоз гепатоцитов [1].

Накопление большого количества активных форм кислорода и повреждение ДНК нередко приводит к активации апоптотических механизмов гибели клеток. Важными участниками активации и развития апоптоза являются каспазы, относящиеся к семейству цистеиновых протеаз [2]. В финальной стадии процесса апоптоза задействована эффекторная каспаза-7, которая кодируется геном *Casp7*. Активная каспаза-7 локализована в митохондриальной и микросомальной фракции гепатоцитов [3]. В дополнение к апоптозу каспаза-7 также может играть неапоптотическую роль, например, в развитии клеточного цикла. Исследования показали, что дефицит каспазы-7 оказывает неблагоприятное влияние на прогрессирование клеточного цикла, что приводит к снижению пролиферации клеток [4].

Цель исследования: изучить изменение уровня экспрессии гена *Casp7* в печени крыс при воздействии алкоголя.

Материалы и методы. В эксперименте использовали белых аутбредных крыс-самцов. Животным из опытной группы вводили этанол в дозе 5 г/кг, внутрижелудочно, особи контрольной группы получали дистиллированную в эквивалентном объеме. На 1-е и 3-и сутки после введения этанола животных выводили из эксперимента (по 7 голов на

каждый срок исследования). Печень быстро извлекали и замораживали в жидком азоте. Экстракцию тотальной РНК осуществляли с использованием коммерческого набора ExtractRNA (Евроген, Россия). Пробы подвергали реакции обратной транскрипции с применением реагентов MMLV RT kit (Евроген, Россия). Реакцию амплификации и оценку экспрессии гена проводили в режиме реального времени на амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия). Математическую обработку данных осуществляли с использованием пакета статистических программ Statistics 21.0 (IBM, США). Для оценки статистической значимости различий между группами применяли t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Мы провели сравнительный анализ экспрессии гена *Casp7* в печени крыс через 24 и 72 ч после воздействия этанола. Кратность экспрессии исследуемого гена в печени через 24 и 72 ч практически не изменялась по сравнению с контрольной группой в ответ на введение животным этанола, составив $-0,19 \pm 0,46$ и $-0,03 \pm 0,16$, соответственно ($p > 0,05$).

Изменений транскрипционной активности гена *Casp7*, вовлеченного в регуляцию сигнальных путей развития апоптоза, в нашем исследовании не наблюдалось ни через 24 ч, ни через 72 ч после введения этанола. Полученные результаты, вероятно, свидетельствуют о неблагоприятных условиях для развития каспазного каскада и низкой вероятности активации процесса апоптоза с участием эффекторной каспазы-7. Можно предположить, что 72 ч недостаточно, чтобы вызвать значимые изменения в паттернах экспрессии гена *Casp7*. Многочисленные исследования указывают на применимость ингибиторов каспаз для лечения различных заболеваний, связанных с усилением апоптоза клеток [5, 6]. При этом роль и клиническое значение апоптоза при многих заболеваниях печени все еще остаются противоречивыми. Тем не менее, есть данные, что ингибирование каспаз предотвращает апоптоз, но при этом может модулировать некроптоз и другие каспазозависимые пути апоптоза [7–9].

Таким образом, в условиях проведенного эксперимента интоксикация этанолом практически не влияла на экспрессию гена *Casp7*, вовлеченного в регуляцию апоптоза. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на выявление потенциальных генов, вовлеченных в клеточный ответ на токсическое поражение печени этанолом.

Список литературы

1. Kubiak-Tomaszewska G., Tomaszewski P., Pachecka J. et al. Molecular mechanisms of ethanol biotransformation: enzymes of oxidative and nonoxidative metabolic pathways in human // *Xenobiotica*. 2020. Vol. 50. № 10. P. 1189–1201. doi: 10.1080/00498254.2020.1761571.
2. Kesavardhana S., Malireddi R.K.S., Kanneganti T.D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis // *The Annual Review of Immunology*. 2020. Vol. 38. P. 567–595. doi: 10.1146/annurev-immunol-073119-095439.
3. Chandler J.M., Cohen G.M., MacFarlane M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. № 18. P. 10815–10818. doi: 10.1074/jbc.273.18.10815.
4. Safari F., Farajnia S., Behzad Behbahani A. et al. Caspase-7 deficiency in Chinese hamster ovary cells reduces cell proliferation and viability // *Biological Research*. 2020. Vol. 53. № 1. P. 52. doi: 10.1186/s40659-020-00319-x.
5. Hayakawa Y., Chandra M., Miao W. et al. Dorn GW 2nd, Armstrong RC, Kitsis RN. Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of Galpha(q) transgenic mice // *Circulation*. 2003. Vol. 108. № 24. P. 3036–3041. doi: 10.1161/01.CIR.0000101920.72665.58.
6. Nicholson D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents // *Nature*. 2000. Vol. 407. № 6805. P. 810–816. doi: 10.1038/35037747.
7. Kaiser W.J., Upton J.W., Long A.B. et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice // *Nature*. 2011. Vol. 471. № 7338. P. 368–372. doi: 10.1038/nature09857.
8. Liedtke C., Bangen J.M., Freimuth J. et al. Loss of caspase-8 protects mice against inflammation-related hepatocarcinogenesis but induces non-apoptotic liver injury // *Gastroenterology*. 2011. Vol. 141. № 6. P. 2176–2187. doi: 10.1053/j.gastro.2011.08.037.
9. Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., Kroemer G.. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010. Vol. 11. № 10. P. 700–714. doi: 10.1038/nrm2970.

Попова О.В., Иванова Е.Е.
Марийский государственный университет,
Йошкар-Ола
yasminka1@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО И ПРООКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ КОНЪЮГАТОВ ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА С ТЕТРАФЕНИЛФОСФОНИЕМ

Было проведено исследование прооксидантного действия конъюгатов некоторых производных бетулина с тетрафенилфосфонием по уровню малонового диальдегида. Кроме того, оценивалась и антиоксидантная эффективность данных конъюгатов по уровню активности супероксиддисмутазы и по изменению общей антиокислительной активности гемолизата эритроцитов.

Ключевые слова: бетулин, производные бетулина, конъюгаты с ТФФ⁺, антиоксидантное действие, прооксидантное действие.

Popova O.V., Ivanova E.E.
Mari State University,
Yoshkar-Ola

STUDY OF THE ANTIOXIDANT AND PROOXIDANT EFFECTS OF SOME CONJUGATES OF BETULIN DERIVATIVES WITH TETRAPHENYLPHOSPHONIUM

A study of the prooxidant effects of the conjugates of some derivatives of betulin with tetraphenylphosphonium in terms of the level of malondialdehyde. In addition, the antioxidant efficiency of these conjugates was also evaluated by the level of superoxide dismutase activity and by changes in the total antioxidant activity of erythrocyte hemolysate.

Keywords: betulin, betulin derivatives, conjugates with TPP⁺, antioxidant action, prooxidant action.

В последнее время одними из многообещающих соединений с точки зрения фармакологии являются природные соединения — тритерпены, в число которых входит и бетулин. Это тритерпен лупанового ряда. Известно также множество синтетических трансформаций этого вещества, обладающих биологической активностью. К таким производным, например, относятся бетулиновая и бетулоновая кислоты. Для

бетулина и его производных известны антибактериальные, противоопухолевые, гиполипидемические, гепатопротекторные, противовирусные и другие эффекты. Существенным преимуществом их использования является относительно низкая токсичность данных соединений [1].

Исследование прооксидантного и антиоксидантного действия природных веществ и синтезируемых производных является актуальным. Любое нарушение антиоксидантного статуса организма может привести к окислительному стрессу, вызывающему патологические процессы.

Целью работы явилось изучение антиоксидантного и прооксидантного действия конъюгатов производных бетулина с тетрафенилфосфонием *in vitro*. Прооксидантное действие оценивали по образованию малонового диальдегида (МДА) в гемолизате эритроцитов. Антиоксидантное действие изучали по изменению активности супероксиддисмутазы (СОД) в крови и по общей антиокислительной активности (ОАА) гемолизата эритроцитов. Исследования проведены на базе кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии Марийского государственного университета. В экспериментах использованы белые беспородные половозрелые крысы-самцы, содержащиеся в стандартных условиях вивария с 8-часовым световым периодом и беспрепятственным доступом к воде и корму. Забор крови осуществляли после декапитации животных в пробирки с антикоагулянтом цитратом натрия. Плазму немедленно отделяли от форменных элементов методом центрифугирования. Эритроциты трижды отмывали охлажденным физиологическим раствором. Исследуемые вещества — P2 и P3, F19 были предоставлены Институтом нефтехимии и катализа Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук. Конъюгат P2 состоит из бетулиновой кислоты и связанного с ней через PEG-линкер тетрафенилфосфония бромида (ТФФ-бромида). Конъюгат P3 так же состоит из бетулиновой кислоты и ТФФ-бромида, однако вместо PEG-линкера используется углеводородный линкер. У конъюгата F19 в качестве производного бетулина используется бетулоновая кислота. К ней через углеводородный линкер присоединен ТФФ-бромид. Действие описанных конъюгатов исследовали в экспериментах *in vitro* в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ. Для этого их добавляли в анализируемой концентрации к взвеси отмытых эритроцитов, инкубировали 5–7 минут, затем эритроциты использовали для оценки показателей.

Определение содержания МДА основано на измерении окрашенного комплекса, образующегося при взаимодействии МДА с тиобарбиту-

ровой кислотой (ТБК). МДА является вторичным метаболитом перекисного окисления липидов (ПОЛ). Его высокий уровень может свидетельствовать об усилении течения процессов ПОЛ, например, при окислительном стрессе. [2] Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Уровень МДА в гемолизате эритроцитов в присутствии исследуемых веществ в разных концентрациях и в их отсутствии

Исследуемое вещество	Содержание МДА, мкмоль/л (M±m), (n=3)		
	100 мкМ	50 мкМ	10 мкМ
F19	2,240±0,543	3,953±0,043	1,430±0,046
P3	4,420±0,11	5,723±0,357	6,110±0,559
P2	5,983±0,037*	1,753±0,072	3,807±0,026
Контроль	2,710±0,365		

* Статистически достоверные различия между контролем (отсутствие вещества) и опытом (действие исследуемого вещества) ($p < 0,01$).

Было выявлено увеличение уровня МДА в гемолизате эритроцитов под действием конъюгата P2 в концентрации 100 мкМ в 2,2 раза ($p = 0,00264$) по сравнению с контролем (без веществ). Вещество F19, активным компонентом которого является бетулоновая кислота, никак не повлияло на уровень МДА, за исключением незначительного снижения при концентрации 10 мкМ. Конъюгат P3 также не показал значимого эффекта. Вероятной причиной выявленного эффекта вещества P2 в концентрации 100 мкМ может быть высокая концентрация вещества, но нельзя исключать и связи со структурой — основу конъюгата составляет бетулиновая кислота. Бетулиновая кислота является лупаном, имеет двойную связь в положении C-20(29), C-3 β -гидрокси- и C-28-карбоксильную группы. Интересно отметить, что тетрафенилфосфоний (ТФФ⁺) представляет собой многоатомный катион, состоящий из четырех фенильных групп, соединенных при помощи фосфора в центре, и по фармакологической классификации MeSH относится к противоопухолевым агентам [3].

Показатель активности СОД относится к одним из доказательств антиоксидантных свойств веществ, которые повышают уровень активности эндогенной СОД в организме. Этот фермент обеспечивает обрыв цепей кислородзависимых свободнорадикальных реакций. Было изучено влияние конъюгатов производных бетулина с ТФФ⁺ на активность СОД. Метод оценки активности СОД основан на способности

данного фермента ингибировать аутоокисление низких концентраций адреналина, которое инициируется супероксидными радикалами, возникающими при взаимодействии адреналина со следами металлов в щелочной среде. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2. Активность СОД в крови в присутствии исследуемых веществ в разных концентрациях и в их отсутствии

Исследуемое вещество	Активность СОД, мМ адреналина/мин на 1 мл гемолизата ($M \pm m$), (n=3)		
	100 мкМ	50 мкМ	10 мкМ
F19	0,975±0,159*	0,357±0,087	0,644±0,052*
P3	0,854±0,095*	0,085±0,009	0,442±0,022*
P2	0,917±0,101*	0,560±0,043*	0,558±0,063*
Контроль	0,208±0,021		

* Статистически достоверные различия между контролем (отсутствие вещества) и опытом (действие исследуемого вещества) ($p < 0,01$).

Все три конъюгата в концентрации 100 мкМ повышали активность СОД в крови примерно в 4 раза по сравнению с контролем (F19 ($p=0,00867$), P3 ($p=0,00538$) и P2 ($p=0,00717$)). В концентрации 50 мкМ конъюгат P2 увеличивал активность СОД в 2,5 раза по сравнению с контролем в 2,5 раза ($p=0,00376$). Вещество P3 в исследуемой концентрации наоборот несколько снижало активность СОД, но также как и действие конъюгата F19, было не значимо. В концентрации 10 мкМ все три исследуемых конъюгата продемонстрировали существенное влияние на активность СОД. Наблюдалось увеличение активности СОД под воздействием вещества F19 в 3 раза ($p=0,00458$), вещества P3 — в 2 раза ($p=0,00319$), вещества P2 — в 2,5 раза ($p=0,00628$).

Соотнося увеличение активности СОД под действием исследуемых веществ с повышением уровня МДА следует отметить, что СОД является одним из первых ферментов антиоксидантной защитной системы, реагирующий на повышение уровня активных форм кислорода (АФК). Таким образом, повышение активности СОД и одновременное увеличение уровня МДА может говорить о прооксидантном эффекте веществ P3 и P2. Вещество же F19 показало увеличение активности СОД в концентрации 100 мкМ и 10 мкМ, однако в этих же концентрациях снижало уровень МДА, хоть и незначительно. Прооксидантный эффект веществ P3 и P2 скорее всего связан с наличием в веществах бетулиновой, а не бетулоновой, кислоты. Вещество P3 в концентрации 50 мкМ показало незначительное снижение активности СОД в 2 раза,

это может быть связано с повышением уровня МДА, который может накапливаться и ингибировать синтез СОД, либо образовывать аддукты с ферментом.

Как известно, антиоксидантные ферменты, а не малые антиоксидантные молекулы (неферментные антиоксиданты) играют главную роль в антиоксидантной защите организма. Нарушение работы любого из этих ферментов или других звеньев антиоксидантной системы приводит к снижению антиокислительной защиты организма [4].

Определение общей антиокислительной активности (ОАА) основано на регистрации скорости окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола (2,6-ДХФИФ) кислородом, растворенным в реакционной среде. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Общая антиокислительная активность в гемолизате эритроцитов в присутствии исследуемых веществ в разных концентрациях и в их отсутствии

Исследуемое вещество	ОАА, уд.ед./мин на 1 мл гемолизата (M±m) (n=3)		
	100 мкМ	50 мкМ	10 мкМ
F19	0,070±0,001*	0,051±0,002	0,025±0,003
P3	0,061±0,002*	0,028±0,003	0,038±0,004
P2	0,066±0,002*	0,058±0,002*	0,032±0,002
Контроль	0,039±0,001		

* Статистически достоверные различия между контролем (отсутствие вещества) и опытом (действие исследуемого вещества) ($p < 0,01$).

ОАА увеличивается при добавлении исследуемых веществ в концентрации 100 мкМ (конъюгатом F19 — в 1,8 раза ($p=0,000135$), конъюгатом P3 — в 1,6 раза ($p=0,000517$), конъюгатом P2 — в 1,7 раза ($p=0,00102$)) и 50 мкМ (конъюгатом P2 — в 1,5 раза ($p=0,00174$), конъюгатом F19 — в 1,3 раза ($p=0,01455$)), за исключением вещества P3, которое незначительно снижало ОАА при его добавлении в концентрации 50 мкМ ($p=0,03227$). Исследуемые вещества в концентрации 10 мкМ также несколько снижали ОАА, но данные изменения оказались не значимы по сравнению с контролем.

Таким образом, увеличение ОАА под влиянием веществ в концентрации 100 мкМ позволяет говорить об антиоксидантной активности исследуемых веществ. Конъюгат F19 в концентрации 100 мкМ повышал ОАА и активность СОД и не оказывал влияния на уровень МДА, что может отражать его антиоксидантную активность путем активации ключевого фермента антиоксидантной системы защиты.

При добавлении веществ в концентрации 10 мкМ наблюдалось незначительное снижение показателя ОАА, несмотря на увеличение активности СОД при этой же концентрации действующих веществ. Это может быть связано с вероятным снижением активности других антиоксидантных ферментов (не исследовано), помимо СОД, а также с перегрузкой антиоксидантной системы. Стоит отметить, что имеются исследования, показавшие подобные эффекты бетулина и его производных в низких концентрациях [5,6]. Увеличение активности СОД помимо повышения антиоксидантной активности может говорить еще и о реакции антиоксидантной системы на неблагоприятные условия, вызванные исследуемыми веществами. В таком случае, даже при увеличении активности СОД, показатель общей антиокислительной активности будет снижен.

Подводя итог, можно сказать, что конъюгат Р2 проявляет преимущественно прооксидантный эффект благодаря наличию бетулиновой кислоты, которая имеет в структуре гидроксильную группу и, скорее всего, благодаря этой группе проявляет более сильные прооксидантные свойства.

На активность веществ возможно так же влияет линкер, соединяющий ТФФ+ с производным бетулина. Вещество Р3, являющееся конъюгатом бетулиновой кислоты и ТФФ+ через углеводородный линкер, показало прооксидантную активность — уровень МДА при добавлении Р3 имеет незначительный рост при небольших концентрациях 50 мкМ и 10 мкМ, в то время как активность СОД и ОАА выросли в меньшей степени, чем при добавлении веществ F19 и P2, имеющих ПЭГ-линкер.

Список литературы

1. Król S.K. et al. Comprehensive Review on Betulin as a Potent Anticancer Agent // *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015. 11 p.
2. Воробьев В.И., Щербакова Е.Н., Захаркина Н.И. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у свиней в процессе постнатального онтогенеза // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 2–3. С. 247.
3. Thomadaki H. et al. Enhanced Antileukemic Activity of the Novel Complex 2,5-Dihydroxybenzoate Molybdenum(VI) against 2,5-Dihydroxybenzoate, Polyoxometalate of Mo(VI), and Tetraphenylphosphonium in the Human HL-60 and K562 Leukemic Cell Lines // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007. Vol. 50. № 6. P. 1316–1321.
4. Лапшина Е.А. и др. Гипохлорная кислота модифицирует ферменты пентозо-фосфатного пути и антиоксидантной защиты в тканях

печени и сердца крысы *in vitro* // Биомедицинская химия. 2006. Т. 52. № 5. С. 469–478.

5. Kruszniewska-Rajs C. et al. The Influence of Betulin and Its Derivatives EB5 and ECH147 on the Antioxidant Status of Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23. № 5. 2524.

6. Dubinin M.V. et al. Effect of F16-Betulin Conjugate on Mitochondrial Membranes and Its Role in Cell Death Initiation // Membranes (Basel). 2021. Vol. 11. № 5. 352.

УДК 577.1

Саврей А.М., Жерегеля С.Н.

*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
anna.savrei109@gmail.com*

РОЛЬ РНК-ДЕМЕТИЛАЗЫ ALKBH5 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

РНК-деметилаза ALKBH5 играет тревожную роль в различных злокачественных новообразованиях человека. Множество исследований ясно демонстрирует ее значение в некоторых физиологических процессах. Различные литературные данные указывают на причастность данного фермента ко многим патологическим процессам, включая рак молочной железы.

Ключевые слова: модификация тбА, ALKBH5, деметилирование РНК, рак молочной железы.

Savrei A.M., Geregely S.N.

*St. Petersburg State Pediatric Medical University,
St. Petersburg, Russia*

THE ROLE OF RNA DEMETHYLASE ALKBH5 IN BREAST CANCER

RNA demethylase ALKBH5 plays an alarming role in various human malignancies. Many studies clearly demonstrate its importance in some physiological processes. Various literature data indicate the involvement of this enzyme in many pathological processes, including breast cancer.

Keywords: тbA modification, ALKBH5, RNA demethylation, Cancer, breast cancer.

На сегодняшний день принято считать, что сложность транскриптома содержит в себе огромное количество транскриптов, кодирую-

щих белки, также он включает в себя множество некодирующих участков РНК. У некодирующих участков есть несколько типов регуляторных РНК, у которых функции и механизмы действия сравнительно определены, так, например, микроРНК и piwi-взаимодействующие РНК, и менее охарактеризованные классы РНК (такие как длинные некодирующие РНК — lncRNAs). Представляется, что эти транскрипты играют значимую роль во многих клеточных процессах: гибель клеток, рост, дифференциация, апоптоз, эпигенетическая регуляция и многое другое. Хотя функция почти большинства lncRNAs остается в некоторой степени неисследованной и неизвестной [1].

В настоящее время известно о более 170 посттранскрипционных модификациях различных типов РНК, причем N6-метиладенозин (m6A) к настоящему времени является хорошо изученной модификацией РНК. Модификация m6A впервые описана около пятидесяти лет назад (1970-е годы) и была идентифицирована как наиболее распространенная внутренняя модификация полиаденилированных мРНК у большинства эукариотических видов, включая млекопитающих [4, 5]. В 2010-х годах разработка различных методов секвенирования модификаций m6A позволила получить дополнительное представление о такой эпигенетической метке, выявив присутствие участка m6A практически во всех типах РНК, таких как мРНК, рРНК, микроРНК, длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК и мяРНК. Модификация m6A подвергается динамической регуляции РНК-метилтрансферазами («писателями») и деметилазами («стирателями») [3].

Одним из главных вопросов является работа фермента РНК-деметилазы ALKBH5.

РНК-деметилаза ALKBH5 (Alkylation Repair Homolog 5, альфа-кетоглутарат-зависимая гидроксилаза 5) принимает участие в модуляции модификаций m6A и контролирует различные клеточные процессы. РНК-деметилаза ALKBH5 представляет собой белок третичной структуры в состав которого входит 394 аминокислоты, активный центр содержит участки для связывания Fe(II), α -кетоглутарата и распознавания субстрата, а также дополнительную петлю, приводящую к предпочтительному взаимодействию с одноцепочечными по сравнению с двухцепочечными нуклеиновыми кислотами. ALKBH5-опосредованное деметилирование m6A регулирует экспрессию генов, влияя на множественные события в метаболизме РНК, например, процессинг пре-мРНК, распад мРНК и трансляцию [5].

Все больше данных показывают, что фермент ALKBH5 играет критическую роль в различных злокачественных новообразованиях человека, в основном посредством посттранскрипционной регуляции онко-

генов или опухолевых белков-супрессоров т6А-зависимым образом. Между тем, увеличение количества некодирующих РНК признано мишенями ALKBH5 при раке [3].

В физиологическом состоянии ALKBH5 демонстрирует высокую экспрессию в семенниках и легких, затем в селезенке, почках и печени, низкую — в сердце и мозге. У мышей с дефицитом ALKBH5 наблюдается нарушение сперматогенеза из-за аномальных уровней основных генов, контролирующих созревание сперматогенеза. Помимо сперматогенеза, значительное участие ALKBH5 было продемонстрировано в остеогенной дифференцировке, регенерации сердца, детерминации сердца эмбриональными стволовыми клетками, развитии мозга, пост-ишемическом ангиогенезе. Аномальная экспрессия ALKBH5 тесно связана с патологиями человека. Было обнаружено, что ALKBH5 участвует в развитии оссификации желтой связки, болезни Гиршпрунга и синдроме ишемии-реперфузии. Кроме того, роль ALKBH5 в заболевании была наиболее широко изучена в контексте развития онкологии [2].

По литературным данным отмечается, что ALKBH5 обычно не регулируется при множественных злокачественных новообразованиях и играет важную роль в качестве т6А-деметилазы. Измененная экспрессия ALKBH5 может как способствовать, так и подавлять канцерогенез в зависимости от типа рака [2].

ALKBH5 играет онкогенную роль при глиоме, глиобластоме, раке яичников, раке эндометрия, раке шейки матки, раке молочной железы, остром миелоидном лейкозе, увеальной меланоме, аденоме гипофиза, плоскоклеточном раке полости рта, плоскоклеточном раке пищевода, раке желудка, вирусе гепатита, внутривенной холангиокарциноме, аденокарциноме легкого. Также фермент играет подавляющую (опухоль) роль при раке поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциноме, раке мочевого пузыря. ALKBH5 имеет противоречивые роли при немелкоклеточном раке легкого, остеосаркоме, почечно-клеточной карциноме, раке толстой кишки [4].

Отмечается, что ALKBH5 вызывает развитие различных злокачественных новообразований путем удаления модификаций т6А на основных РНК [2].

Фермент РНК-деметилазы ALKBH5 играет онкогенную роль при раке молочной железы [3].

Количество ALKBH5 повышено в иммортализованных («бессмертных») клетках по сравнению с их первичными клеточными предшественниками. Кроме того, ALKBH5 также повышено в образцах рака молочной железы по сравнению с нормальной тканью. Снижение коли-

чества ALKBH5 ингибирует жизнеспособность клеток рака молочной железы, образование колоний и миграцию, подтверждая онкогенные свойства ALKBH5 при этом злокачественном новообразовании. При раке молочной железы выявляются клетки, называемые стволовыми клетками рака молочной железы (BCSC), которые могут как самообновляться, так и дифференцироваться в раковые клетки. Стволовые клетки рака молочной железы устойчивы к химиотерапии и выживают после лечения, что приводит к рецидиву опухоли и метастазированию [6].

Как один из регуляторов m6A, ALKBH5 играет важную роль в поддержании баланса между метилированием и деметилированием РНК. Хорошо известно, что посттранскрипционная регуляция экспрессии генов, опосредованная ALKBH5, имеет решающее значение как для нормальных физиологических, так и для патофизиологических событий. Однако остаются некоторые вопросы, требующие решения. Во-первых, заметно, что при некоторых видах рака, включая рак толстой кишки, почечно-клеточный рак и остеосаркому, ALKBH5 играет онкогенную и опухолесупрессирующую роль, что может быть результатом гетерогенности опухоли. Таким образом, требуется всестороннее исследование для изучения точного контекста, в котором ALKBH5 способствует или ингибирует канцерогенез, особенно для тех видов рака, в которых роль ALKBH5 весьма спорна. Во-вторых, недавние исследования показали, что многие регуляторы m6A функционируют при раке независимо от каталитической активности. Однако m6A-независимые функции ALKBH5 и их потенциальная роль в раке остаются неизвестными, что представляет собой еще одно направление для будущих исследований [2].

Учитывая функциональную важность ALKBH5 при множественных злокачественных новообразованиях, включая рак молочной железы, нацеливание на дисрегуляцию ALKBH5 является привлекательным подходом к лечению онкологических заболеваний. Было показано, что ALKBH5 проявляет строгую субстратную специфичность только за счет деметилирования m6A на одноцепочечных РНК, а его модуляция модификации m6A является обратимой, что делает его идеальной терапевтической мишенью. На сегодняшний день исследования выявили несколько ингибиторов ALKBH5. Однако необходимо решить вопросы эффективности, селективности и цитотоксичности [3].

Терапевтическое нацеливание в работе фермента ALKBH5 при онкологических заболеваниях наиболее эффективно только на ранней стадии. Благодаря расширенным знаниям о структуре ALKBH5, механизмах, лежащих в основе ALKBH5-опосредованного канцерогенеза и

реакции на лекарства, наряду с всесторонним доклиническим анализом, терапевтические средства, нацеленные на ALKBH5, могут применяться в клинической практике в будущем [2,4].

Список литературы

1. Бейлерли О.А., Гареев И.Ф. Длинные некодирующие РНК: какие перспективы? // Профилактическая медицина. 2020. № 23(2). С. 124–128.
2. Jianwei Qu, Haimeng Yan, Yifan Hou, Wen Cao, Yang Liu, Enfan Zhang, Jingsong He and Zhen Caicorresponding. RNA demethylase ALKBH5 in cancer: from mechanisms to therapeutic potential. Published online in Pubmed 2022 Jan 21.
3. Zheng G., Dahl JA., Niu Y., Fedorcsak P., Huang CM., Li CJ. et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility // Mol Cell. 2013. № 49. P. 18–29. Pubmed.
4. Boccaletto P., Machnicka MA., Purta E., Piatkowski P., Baginski B., Wirecki TK. et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2018. № 46. P. 303–307. PubMed.
5. Xuan J.J., Sun W.J., Lin P.H., Zhou K.R., Liu S., Zheng LL. et al. RMBase v2.0: deciphering the map of RNA modifications from epitranscriptome sequencing data // Nucleic Acids Research. 2018. № 46. P. 327–334. Pubmed.
6. Zhang C., Zhi W.L., Lu H., Samanta D., Chen I., Gabrielson E. et al. Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217 — and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells // Oncotarget. 2016. № 7. P. 64527–64542. PubMed.

УДК 577.152.344

Соловьева М.А.¹, Бердичевский Г.М.², Васина Л.В.³, Галкин М.А.⁴

*ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»*

Минздрава России,

Санкт-Петербург, Россия

solovyeva_ma@mail.ru¹, grishaber@gmail.com²,

lubov.vasina@gmail.com³, miat2002@mail.ru⁴

ВЛИЯНИЕ ЯДА ЩИТОМОРДНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*AGKISTRODON HALYS*) НА СВЕРТЫВАЮЩУЮ СИСТЕМУ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

*При изучении влияния яда *Agkistrodon halys* на гемостаз были получены данные о наличии в яде биоактивных компонентов,*

обладающих антиагрегантными и антикоагулянтными свойствами, что позволяет рассматривать его в качестве основы для создания новых лекарственных препаратов.

Ключевые слова: *Agkistrodon halys*, гемостаз, агрегация тромбоцитов.

Solov'eva M.A., Berdichevskiy G.M., Vasina L.V., Galkin M.A.
*Pavlov First St. Petersburg State Medical University,
St. Petersburg, Russia*

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF EXTRACT FROM AGKISTRODON HALYS VENOM ON THE HUMAN BLOOD COAGULATION SYSTEM IN VITRO

*The aim of this work was to study the effect of extract from *Agkistrodon halys* venom as well as its fractions on platelet aggregation and blood coagulation. Our data suggest that *Agkistrodon halys* venom contains components exhibiting anti-aggregating and anticoagulant activities. Thus, this venom might be considered as a highly promising source of lead compounds for drug development.*

Keywords: *Agkistrodon halys*, blood coagulation, platelet aggregation.

В настоящее время актуальной проблемой биологической химии остается поиск белков и пептидов, которые могут служить основой для создания лекарственных препаратов. Ценными источниками таких соединений до сих пор остаются яды змей, представляющие собой сложные многокомпонентные белковые смеси с выраженной биологической активностью [1].

В литературе имеются малочисленные данные по изучению влияния яда щитомордников на гемостаз. Так, в работе [2] было установлено, что яды *Agkistrodon halys blomhoffii* и *Agkistrodon halys pallas* содержат несколько изоформ сФЛА₂, обладающих умеренным антикоагулянтным действием.

Были получены данные об ингибировании АДФ- и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов под воздействием сФЛА₂ у *Agkistrodon acutus* [3] и *Agkistrodon halys* [4]. Chen и соавт. [3] установили различия во влиянии сФЛА₂ яда *Agkistrodon acutus* на PRP (обогащенную тромбоцитами плазму) и отмыемые тромбоциты. Фермент обладал сильным угнетающим эффектом в отношении индуцированной АДФ, коллагеном и арахидонатом агрегации тромбоцитов в PRP, однако вызывал агрегацию отмыемых тромбоцитов. Авторы полагают, что эффект фермента на отмыемые тромбоциты связан с высвобождением

ем из тромбоцитарных фосфолипидов арахидоната с последующим образованием индуктора агрегации тромбоксана A_2 .

Целью данной работы явилось исследование влияния яда щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys*) и его отдельных фракций на плазмо-коагуляционный гемостаз в тесте АПТВ (активированного парциального тромбопластинового времени) и функциональную активность тромбоцитов в тесте АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Материалы и методы. Использовали кровь здоровых добровольцев, лиц обоего пола в возрасте 20–30 лет (N=5), которые не получали препараты, влияющие на свертывающую систему крови и функцию тромбоцитов.

Для предотвращения активации тромбоцитов кровь отбирали в вакутейнеры, содержащие 3,8% цитрата натрия.

Стабилизированную кровь для получения богатой тромбоцитами плазмы (PRP, Platelet-rich plasma) центрифугировали 7 минут при комнатной температуре и 1000 оборотов. В минуту (150 г). Часть PRP отбирали в пластиковую пробирку в количестве, необходимом для выполнения анализа. Из оставшейся крови получали бедную тромбоцитами плазму с помощью центрифугирования в течение 30 мин при 3600 оборотов в минуту (2500 г) для калибровки шкалы оптической плотности агрегометра и для исследования антикоагулянтных свойств веществ.

Агрегация тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов в PRP изучали с помощью агрегометра Solar AP 2110 (Беларусь) при 37⁰С и скорости вращения магнитной мешалки 1200 оборотов в минуту. Влияние яда и фракций на агрегацию тромбоцитов оценивали по реакции на добавление к плазме индуктора АДФ (С=10 мкМ).

Яд и лиофилизированные фракции предварительно растворяли в физиологическом растворе (1 мкг в 1 мл).

Ход исследования: в кюветах последовательно смешивали 270 мкл PRP и 30 мкл соответствующих растворов, смесь инкубировали 5 минут при 37 °С, после чего вносили 10 мкл АДФ. В контроле к 270 мкл PRP добавляли 30 мкл физиологического раствора. Агрегацию регистрировали до выхода кривой на плато.

Плазмо-коагуляционный гемостаз. Влияние яда и его фракций на плазменное звено гемостаза оценивали по способности удлинять или сокращать время свертывания бедной тромбоцитами плазмы (по сравнению с контролем) при добавлении в плазму в тесте АПТВ.

Для определения АПТВ использовали набор реагентов «АПТВ-ТЕСТ» фирмы «Технология-Стандарт», Россия. Исследования проводили на коагулометре АПГ2-02-П («ЭКМО», Россия).

Ход исследования: смешивали 50 мкл плазмы и 50 мкл растворов яда и его фракций. Далее смесь инкубировали при 37 °С в течение 60 секунд и в соответствии с протоколом исследования определяли время коагуляции на анализаторе в тесте АПТВ. В контроле в плазму добавляли 50 мкл физиологического раствора. Измерения проводили в 5 повторах.

Результаты. Результаты влияния яда и отдельных фракций *Agkistrodon halys* на показатели гемостаза представлены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние цельного яда и отдельных фракций *Agkistrodon halys* на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов и АПТВ

Субстанция	АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов, % (n=65–85)	АПТВ, с (n=28–40)
Контроль	80,7±1,45	38,4±0,84
Цельный яд	52,7±2,14 ↓	31,5±0,55 ↓
Фракции: 1	100,4±1,12 ↑	41,6±0,49
2	101,6±0,98 ↑	43,0±1,12 ↑
3	92,8±1,54 ↑	40,3±0,89
4	16,9±0,77 ↓	49,4±0,97 ↑
5	72,6±2,11	45,3±1,03 ↑
6	0 ↓↓↓	51,0±0,63 ↑
7	0 ↓↓↓	41,7±1,02
8	40,3±1,02 ↓	40,8±1,11
9	0 ↓↓↓	45,3±0,91 ↑
10	100,5±2,23 ↑	44,5±0,88 ↑
11	88,1±0,98	45,6±2,01 ↑
12	80,5±1,32	110,3±2,45 ↑↑↑
13	33,5±1,52 ↓	76,6±1,43 ↑
14	83,0±2,11	44,4±0,99
15	92,6±0,87 ↑	41,7±0,78
16	>100 ↑↑↑	0 ↓↓↓
17	>100 ↑↑↑	0 ↓↓↓
18	56,9±0,43 ↓	>400 ↑↑↑
19	48,3±1,54 ↓	64,6±1,14 ↑
20	82,5±1,98	43,9±0,98 ↑
21	99,8±0,87 ↑	71,1±1,01 ↑

22	94,5±0,94 ↑	19,9±1,21↓
23	107,6±1,23 ↑	31,6±0,87
24	73,9±2,11	71,7±0,98↑
25	99,3±0,89 ↑	46,3±1,54↑
26	90,0±0,73 ↑	40,9±0,76

Комментарии для теста АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов: ↑ — усиление агрегации, ↓ — подавление агрегации, ↓↓↓ — отсутствие агрегации, ↑↑↑ — гиперагрегация.

Комментарии для теста АЧТВ: ↑ — удлинение АЧТВ, гипокоагуляция, ↓ — уменьшение АЧТВ, гиперкоагуляция, ↓↓↓ — выраженная гиперкоагуляция, ↑↑↑ — выраженная гипокоагуляция.

Как видно из представленных данных, отдельные фракции яда содержат компоненты, обладающие выраженной проагрегантной и прокоагулянтной активностью (фракции 16 и 17), а в некоторых присутствуют антиагреганты (6 и 7 фракции) и антикоагулянты (18 фракция).

Выводы. Несмотря на наличие противоположных эффектов компонентов, содержащихся в отдельных фракциях, цельный яд *Agkistrodon halys* по совокупности свойств оказывает антикоагулянтный эффект на плазмо-коагуляционный гемостаз (удлиняет время АПТВ) и обладает способностью ингибировать агрегацию тромбоцитов (тест АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов).

Таким образом, наличие в яде *Agkistrodon halys* биоактивных компонентов, обладающих антиагрегантными и антикоагулянтными свойствами, свидетельствует о возможности его использования в составе наружных средств, в частности, с венотонизирующим эффектом.

Список литературы

1. Utkin Y.N. Animal venom studies: Current benefits and future developments // World Journal of Biological Chemistry. 2015. № 6(2). P. 28–33.
2. Mounier C.M., Bon C., Kini R.M. Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A (2): protein-versus phospholipid-dependent mechanism of action // Haemostasis. 2001. № 31(3–6). P. 279–287.
3. Chen R.H., Chen Y.C. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon acutus* (five pace snake) and its effect on platelet aggregation // Toxicon. 1989. № 27. P. 675–682.
4. Ouyang C., Yeh H.I., Huang T.F. A potent platelet aggregation inhibitor purified from *Agkistrodon halys* (mamushi) snake venom // Toxicon. 1983. № 21(6). P. 797–804.

УДК 577.1: 616.08

Спасенкова О.М., Ли А.О., Кириллова Н.В., Нечаева Е.А.
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
biochemistry_dept@pharminnotech.com

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА МАЛОБЕНА НА ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Изучена динамика изменения уровня глюкозы, а также концентрация гликогена в печени на экспериментальной модели сахарного диабета второго типа. Исследовано влияние экспериментального вещества малобена и лекарственного препарата метформина на показатели глюкозы и гликогена в группе животных с экспериментальной патологией.

Ключевые слова: сахарный диабет второго типа, глюкоза, гликоген, малобен, метформин.

Spasenkova O.M., Li A.O., Kirillova N.V., Nechaeva E.A.
FSBTI «St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University»
Ministry of Health of the Russian Federation,
St. Petersburg, Russia

INFLUENCE OF THE EXPERIMENTAL SUBSTANCE MALOBEN ON THE INDICATORS OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

The dynamics of changes in glucose levels, as well as the concentration of glycogen in the liver, was studied in an experimental model of type 2 diabetes mellitus. The effect of the experimental substance maloben and the drug metformin on glucose and glycogen parameters in a group of animals with experimental pathology was studied.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, glucose, glycogen, malobene, metformin.

Сахарный диабет — заболевание, обусловленное нарушением углеводного и липидного обменов, крайне негативно влияющее на качество жизни человека. Серьезную проблему представляет собой распространенность данной патологии в мире. За последние несколько десятилетий заболевание непрерывно увеличивается и, по эпидемиологическим прогнозам, к 2030 г. достигнет 7–8% от общей численности

населения мира [3]. Для лечения данной патологии крайне необходимо создание новых лекарственных препаратов, позволяющих оказывать патогенетический лечебный эффект.

Целью исследования было изучение влияния нового экспериментального соединения — производного малоновой кислоты (4,4'-(пропандиамидо)добензоат натрия, малобен) на динамику изменения уровня глюкозы, а также концентрацию гликогена в печени на экспериментальной модели сахарного диабета второго типа [2]. В качестве препарата сравнения использовали метформин.

Исследования выполнены на мышах-самцах линии C57bl/6 массой 18–22 г. Изучение биохимических показателей углеводного обмена оценивали в условиях гипергликемии, используя модель стрептозотоцин индуцированного сахарного диабета (СД), на фоне высокожировой диеты (ВЖД). Большинство пациентов с СД II типа проявляют резистентность к инсулину в дополнение к нарушенной секреции инсулина. Модель с данными характеристиками создается путем введения умеренных доз стрептозотоцина животным, у которых резистентность к инсулину обусловлена предшествующим употреблением рациона с высоким содержанием жиров [4]. Именно комбинация высокожировой диеты с дополнительным введением стрептозотоцина способна наиболее близко воспроизвести основные особенности метаболизма людей, страдающих ожирением и СД II типа.

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

Все экспериментальные животные были разделены на 4 группы (табл. 1).

Таблица 1. Распределение животных по группам

№ группы	Линия животных	Число животных	Препарат, доза
1	Интактная группа (стандартный корм)	9	–
2	Контроль, высокожировая диета	10	Вода очищенная
3	Высокожировая диета + метформин	9	Метформин, 300 мг/кг
4	Высокожировая диета + малобен	9	Малобен, 60 мг/кг

Как видно из представленных результатов на рис. 1, через 5 недель высококалорийной диеты в печени крыс наблюдали достоверное повышение глюкозы в периферической крови экспериментальных животных до 6,9 ммоль/л. Результаты уровня глюкозы в крови после лечения препаратом сравнения метформином на модели высокожировой диеты в сочетании с инъекцией стрептозотоцина представлены на рис. 2.

При моделировании СД, через 72 часа после введения стрептозотоцина, как и ожидалось, происходило развитие гипергликемии, о чем свидетельствует статистически значимое увеличение концентрации глюкозы в периферической крови экспериментальных животных до 12,1 ммоль/л за счет снижения продукции инсулина клетками поджелудочной железы.

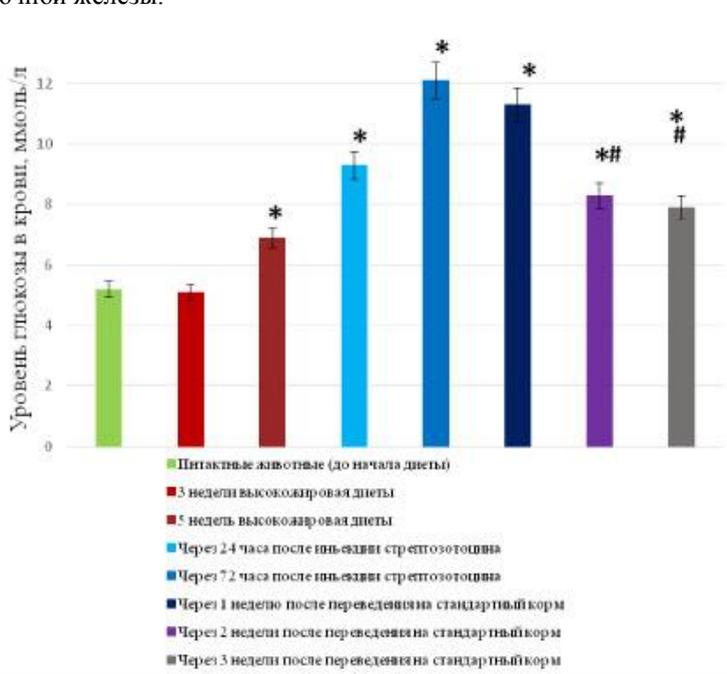


Рис. 1. Динамика изменения уровня глюкозы в сочетании высокожировой диеты с инъекцией стрептозотоцина.

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к интактным животным;

$p < 0,05$ по отношению к животным после инъекции стрептозотоцина.

Как видно из представленных данных, применение препарата сравнения — метформина в течение трех недель приводило к снижению уровня глюкозы крови до 6,0 ммоль/л.

Данные о влиянии малобена на содержание глюкозы в крови приведены на рис. 3. После введения стрептозотоцина уровень глюкозы в периферической крови увеличивался и составлял через 24 и 72 часа 10,7±0,4 ммоль/л и 12,7±0,6 соответственно. Введение малобена животным с экспериментальным СД 2-го типа приводило к нормализации уровня глюкозы в периферической крови крыс до 5,8 ммоль/л.

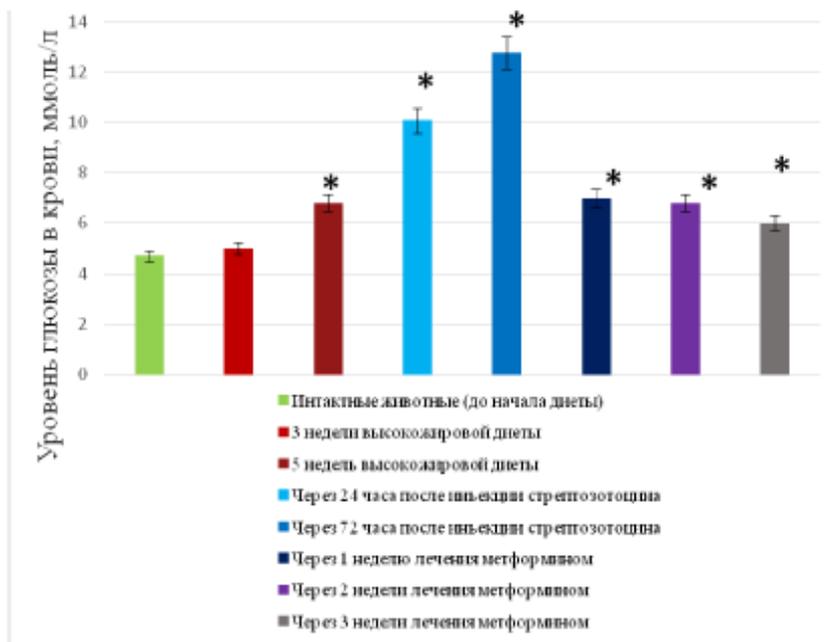


Рис. 2. Динамика изменения уровня глюкозы в периферической крови экспериментальных животных после лечения метформином.

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к интактным животным

Как видно из представленных данных, применение препарата сравнения — метформина в течение трех недель приводило к снижению уровня глюкозы крови до 6,0 ммоль/л.

Данные о влиянии малобена на содержание глюкозы в крови приведены на рис. 3.

После введения стрептозотоцина уровень глюкозы в периферической крови увеличился и составлял через 24 и 72 часа $10,7 \pm 0,4$ ммоль/л и $12,7 \pm 0,6$ соответственно. Введение малобена животным с экспериментальным СД 2-го типа приводило к нормализации уровня глюкозы в периферической крови крыс до $5,8$ ммоль/л.

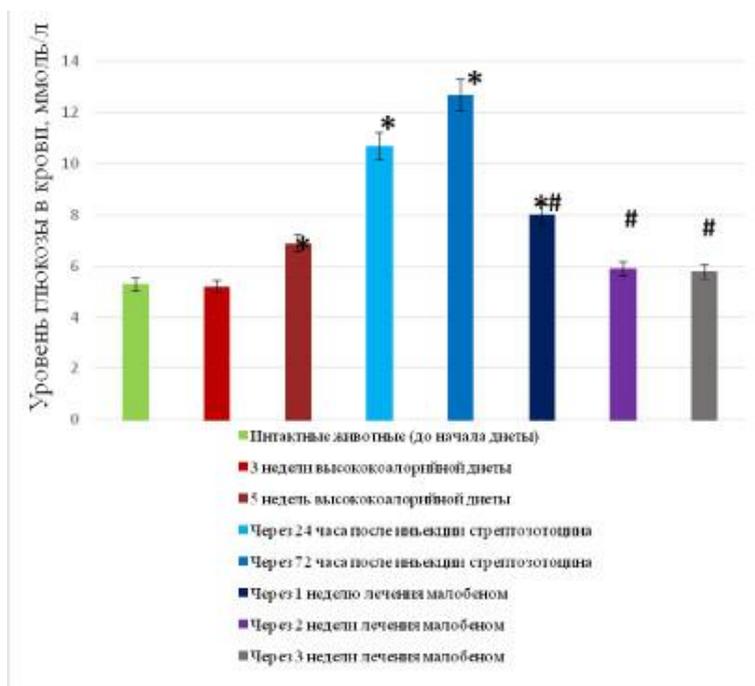


Рис. 3. Динамика изменения уровня глюкозы в крови экспериментальных животных после лечения малобеном

В данном исследовании также изучали динамику содержания гликогена в печени экспериментальных животных. На рис. 4 представлены экспериментальные данные по содержанию гликогена в печени интактных крыс, крыс с экспериментальной гипергликемией на модели высокожировой диеты в сочетании с инъекцией стрептозотоцина, а также 2 групп животных, получавших на фоне высокожировой диеты, при этом ограниченные сроки высококалорийной диеты не способствуют развитию инсулинорезистентности тканей.

После введения животным при экспериментальной гипергликемии метформина содержание гликогена в печени уменьшалось на 20% и

составило $6,60 \pm 0,55$ мг/г ткани, а введение малобена содержание гликогена снижалось на 36,6% и составило $5,20 \pm 0,60$ мг/г ткани по сравнению с контролем, что приводило к нормализации концентрации гликогена в печени крыс.

Таким образом, изучаемое экспериментальное соединение малобен у животных с экспериментальным СД 2-го типа приводило к нормализации уровня глюкозы в периферической крови и концентрации гликогена печени у крыс также, как и препарат сравнения метформин, что является перспективным для коррекции патобиохимических нарушений гипергликемического характера.

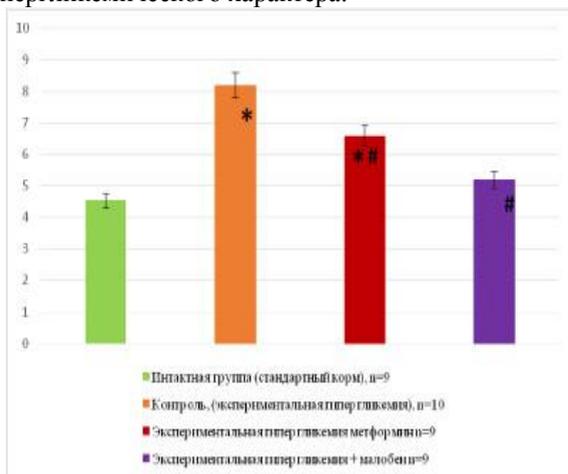


Рис. 4. Содержание гликогена в тканях печени крыс при экспериментальной гипергликемии.

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к интактным животным;
$p < 0,05$ по отношению к контрольным животным

Список литературы

1. Давченко Е.О., Чиркин А.А. Новый методический подход к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов // Судебно-медицинская экспертиза. 2010. № 3. С. 25–28.
2. Патент РФ № 2702003/03.10.2019.
3. Ярмолинская М.И., Андреева Н.Ю., Абашова Е.И., Мишарина Е.В. Экспериментальные модели сахарного диабета 1-го типа // Журнал акушерства и женских болезней. 2019. Т. 68. № 2. С. 109–118.

4. Wang R., Koretz R., Yee H. Is weight reduction an effective therapy for nonalcoholic fatty liver? A systematic review // The American Journal of Medicine. 2003. № 115. P. 554–559.

УДК 616.858-07

Сухопаров П.Д., Вольхина И.В.

*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия
pashsukhoparov@gmail.com*

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Важным шагом для лечения нейродегенеративных заболеваний является диагностика на доклинических стадиях, которая требует в настоящее время использования высокоспециализированного оборудования. Одним из перспективных методов ранней диагностики является выявление специфических биомаркеров в биологических средах.

Ключевые слова: биомаркеры; болезнь Паркинсона (БП); нейродегенерация, тремор.

Sukhoparov P.D., Volkhina I.V.

*St. Petersburg State Pediatric Medical University
St. Petersburg, Russia*

POTENTIAL MARKERS OF PARKINSON'S DISEASE

An important step for the treatment of neurodegenerative diseases is diagnosis in the preclinical stages, which currently requires highly specialized equipment. One promising method of early diagnosis is the detection of specific biomarkers in biological media.

Keywords: biomarkers; Parkinson's disease (PD); neurodegeneration, tremor.

Болезнь Паркинсона (БП) является хроническим медленно прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием с преимущественным поражением базальных ганглиев, для которого характерны тремор, мышечная ригидность, гипокинезия, постуральная неустойчивость, а также вегетативные и психические расстройства. За последние три десятилетия было отмечено значительное увеличение распространенности БП.

Диагностика болезни Паркинсона в настоящее время в основном зависит от клинических симптомов, что затрудняет выявление самых ранних фаз заболевания, когда лечение может иметь наибольший терапевтический эффект. Надежные специфические диагностические и прогностические маркеры могут помочь в выявлении данного заболевания, разработке новых нейропротекторных терапевтических подходов и прогнозировании ответа на лечение больного.

Целью данного исследования стали систематизация, анализ и обобщение научных данных о потенциальных маркерах болезни Паркинсона в биологических жидкостях.

К перспективным биомаркерам БП в настоящее время относят достаточно широкий спектр белков, ферментов, а также показателей оксидативного стресса и воспаления.

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) — мономерный высокоспецифичный мозговой белок массой 51 кДа, участвующий в поддержании формы и подвижности астроцитарных отростков. Также он способствует миелинизации, поддержанию целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и архитектуры белого вещества [1]. В патогенезе БП в результате нарушения структурной целостности астроцитов происходит высвобождение GFAP и, в большей степени, продукта его распада (GFAP-BDP) в интерстициальную жидкость. Затем они попадают в ЦСЖ и кровь. Главным достоинством GFAP в качестве биомаркера выступает то, что он имеет сильную мозговую специфичность и высокую экспрессию в мозге [2].

Белок DJ-1, также известный, как деликаза, связанная с паркинсонизмом, кодируемая геном PARK7 [3]. Имеет массу 20 кДа и состоит из 189 аминокислот с семью β -нитями и девятью α -спиралями в общей сложности, присутствует в виде димера.

В окисленном состоянии белок DJ-1 ингибирует агрегацию α -синуклеина посредством своей шапероновой активности, таким образом, функционируя как окислительно-восстановительный шаперон. DJ-1 экспрессируется почти во всех клетках организма. В мозге встречается во всех тканях как в нейронах, так и в глии [3]. Его увеличение отражает окислительный стресс у пациентов с БП.

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor) является мощным ингибитором опосредованной апоптозом гибели клеток и индуцированной нейротоксином дегенерации дофаминергических нейронов. Снижение его экспрессии в черной субстанции связано с ухудшением состояния дофаминергических нейронов. Таким образом, BDNF служит потенциальным биомаркером БП. Уровень BDNF в спинномозговой жидкости коррелирует с когни-

тивными способностями у пациентов с БП. Его определение возможно с использованием иммуноферментного анализа [5].

Белок легкой цепи нейрофиламента. Нейрофиламенты обеспечивают форму и размер нейронов, являясь основными структурными элементами клетки. Они состоят из трех субъединиц: белки легкой цепи (60 кДа), средней цепи (100 кДа) и тяжелой цепи нейрофиламента (110 кДа). Наличие в ЦСЖ белков легкой цепи свидетельствует о нейродегенерации. Повышенные уровни нейрофиламентов отражают дегенерацию крупных миелинизированных аксонов. Возрастающий уровень нейрофиламентов является очень чувствительным фактором для выявления более агрессивной гибели нейронов, что может быть очень полезно при дифференциальной диагностике БП [6].

α -Синуклеин (ASN, α Syn) ASN является небольшим нейрональным белком, состоящим из 140 аминокислот, обнаруживается в основном в пресинаптических терминалях, у человека кодируется геном SNCA. Выявляется преимущественно в неокортексе, гиппокампе и черной субстанции, но встречается и в других отделах головного мозга. Присутствует также в астроцитах и олигодендроцитах. Составляет примерно 1% от общего пула растворимого белка мозга. Обнаруживается и в других тканях, например, в клетках крови, сердца и мышц. Хотя функция α -синуклеина недостаточно изучена, исследования показывают, что он играет роль в ограничении подвижности синаптических пузырьков, следовательно, ослаблении их рециклинга и высвобождения нейромедиаторов.

Основной причиной гибели дофаминергических нейронов является агрегация этого белка в так называемые тельца Леви. В эукариотических клетках альфа-синуклеин находится только в тетрамерной форме, обладающей выраженной альфа-спиральной структурой. Установлено, что тетрамер совершенно не образует агрегаты, в отличие от мономерной формы. Из этого можно предположить, что образование телец Леви при паркинсонизме связано с тем, что тетрамеры неустойчивы и разрушаются, в результате образуется большое количество склонных к агрегации мономеров.

Непосредственно уровень мономерного альфа-синуклеина не отличается у пациентов с БП и здоровых людей.

Тельца Леви образуются в основном из посттрансляционно модифицированного α -Syn. Известно также, что 90% от депонированного альфа-синуклеина является фосфорилированным, в то время как у здоровых людей — только 4% от общего количества. И средний уровень общего количества фосфорилированного альфа-синуклеина в плазме выше у пациентов с БП [7, 8]. Перспективным является измерение мо-

дифицированных и олигомерных форм в крови и других биологических жидкостях, но это требует развития методов детекции.

Лизосомальные ферменты (гликоцереброзидаза, катепсины). Лизосомная дисфункция и нарушения все чаще признаются центральным событием в патофизиологии БП, таким образом выступая в качестве его потенциального биомаркера. В случае лизосомных нарушений наблюдается агрегация ASN как общий признак заболевания.

Обнаружение лизосомальных ферментов и белков в спинномозговой жидкости может служить неспецифическим биомаркером БП. Сочетание лизосомальных маркеров ЦСЖ с видами ASN и индикаторами митохондриальной дисфункции, воспаления и других патологических белков при БП может способствовать более точной диагностике. Кроме того, дефицит лизосомального фермента β -гликоцереброзидазы увеличивает риск паркинсонизма, который, по-видимому, обусловлен прямым влиянием дефицита фермента и лизосомальной дисфункции на агрегацию α -синуклеина. Следовательно, активность β -гликоцереброзидазы в спинномозговой жидкости в дальнейшем может служить биомаркером болезни Паркинсона [8].

Биомаркеры оксидативного стресса. Оксидативный стресс является причиной запуска и прогрессирования нейродегенеративного процесса. Некоторые косвенные маркеры оксидативного стресса, такие как 8-гидроксидеоксигуанозин (8-OHdG) связаны с прогрессированием БП и не зависят от проведения дофаминергической терапии.

8-OH-дезоксигуанозин (8-OHdG) — модифицированный нуклеозид, образующийся в молекуле ДНК в результате воздействия активных форм кислорода и других повреждающих факторов. Он обладает выраженными мутагенными свойствами и в настоящее время рассматривается в качестве клинико-лабораторного маркера оксидативного стресса и канцерогенеза (развития опухоли).

Под воздействием активных форм кислорода молекула ДНК подвергается биохимическим изменениям, некоторые из которых обладают мутагенными и канцерогенными эффектами. Одно из таких изменений — окисление азотистого основания гуанина и образование 8-OHdG. В отличие от нормального нуклеозид (дезоксигуанозина), образующего парные комплексы гуанин-цитозин, модифицированный гуанозин 8-OHdG утрачивает способность к комплементарному взаимодействию азотистых оснований, и получают комплексы гуанин-тимин или гуанин-аденин.

В отличие от других модифицированных окисленных форм гуанина, 8-OHdG легко проникает из клеток в кровоток. Благодаря этому он

считается одним из лучших клинико-лабораторных маркеров оксидативного стресса.

Известно, что у пациентов с прогрессирующей болезнью Паркинсона уровень секретируемого в моче 8-OHdG возрастал по сравнению со здоровыми людьми. Таким образом, 8-OHdG можно использовать в качестве маркера, который показывает степень развития заболевания.

Наиболее важным нейтрализатором свободных радикалов в головном мозге является эндогенная антиоксидантная система глутатиона, функция которого зависит от двух ферментов, глутатион-пероксидазы (GPX) и глутатион-S-трансферазы (GST), ответственных за переход молекул из окисленного состояния в восстановленное. При БП выявлено повышение уровня окисленной формы глутатиона и GST не только в черной субстанции, но и в периферических клетках крови, что не исключает потенциальную роль этих антиоксидантных агентов в качестве биомаркеров БП.

Ураты — анионная форма мочевой кислоты (2,6,8-триоксипури), преобладающая при нейтральном pH как внутриклеточно, так и во всех жидкостях организма. Мочевая кислота — важный эндогенный антиоксидант с высокой концентрацией в головном мозге и сыворотке крови. Доказательства результатов метаанализа показали более низкий уровень мочевой кислоты в сыворотке крови у пациентов с БП, чем у здоровых людей, и этот вывод более заметен у мужчин, чем у женщин. Таким образом, уровень мочевой кислоты в сыворотке крови может быть потенциальным биомаркером БП [4].

Неоднозначны данные, полученные при исследовании в ЦСЖ уровня общего и фосфорилированного **тау-протеина** как биомаркера БП. Тем не менее большинство исследователей выдвинули предположение о возможной связи этих биомаркеров с прогрессированием заболевания и развитием когнитивных нарушений у пациентов с БП [8, 10].

В патогенезе БП имеет место нейровоспалительный процесс, поэтому в актуальных исследованиях немало внимания уделено **биомаркерам воспаления**. В исследовании 2008 года было обнаружено, что высокий уровень ИЛ-6 в плазме крови увеличивает риск БП в 3,5 раза [9, 10].

Специфические антитела. В результате повреждения и дегенерации нейронов образуется клеточный детрит, компоненты которого являются антигенами для организма и вызывают иммунный ответ, который влечет за собой появление различных антител в плазме крови.

Существует ряд потенциальных маркеров для диагностики БП на доклинической стадии. Многие биомаркеры обладают относительной

специфичностью и ни один не может гарантировать точную постановку диагноза. В настоящий момент их применение затруднительно. В связи с этим, дальнейшее изучение биомаркеров и их комбинаций, возможно, является ключом к ранней и достоверной диагностике заболевания. Стоит отметить, что для точной диагностики необходимо использовать исключительно комплексный подход и дифференцировать заболевание по совокупности имеющихся маркеров и других клинических признаков.

Список литературы

1. Mayer C.A., Brunkhorst R., Niessner M., Pfeilschifter W., Steinmetz H., Foerch C. Blood levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in patients with neurological diseases // *PLoS One*. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0062101.
2. Yang Z., Wang K.K. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker // *Trends in Neurosciences*. 2015. № 38. P. 364–374. doi: 10.1016/j.tins.2015.04.003.
3. Saito Y. Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2014. № 54. P. 138–144. doi: 10.3164/jcbn.13-108.
4. Shen L., Ji H.F. Low uric acid levels in patients with Parkinson's disease: evidence from meta-analysis // *BMJ Open*. 2013. doi: 10.1136/bmjopen-2013-003620.
5. Costa A., Peppe A., Carlesimo G.A., Zabberoni S., Scalici F., Caltagirone C. et al. Brain-derived neurotrophic factor serum levels correlate with cognitive performance in Parkinson's disease patients with mild cognitive impairment // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2015. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00253.
6. Khalil H., Alomari M.A., Khabour O.F., Al-Hieshan A., Bajwa J.A. Circulatory levels of Bdnf correlate with cognitive deficits in people with Parkinson's disease // *Movement Disorders*. 2016. doi: 10.1016/j.jns.2016.01.032.
7. Magdalinou N., Lees A.J., Zetterberg H. Cerebrospinal fluid biomarkers in parkinsonian conditions: an update and future directions // *Journal Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014. № 85. P. 1065–1075. doi: 10.1136/jnnp-2013-307539.
8. Montine T.J., Shi M., Quinn J.F., Peskind E.R., Craft S., Ghingina C. CSF A β (42) and tau in Parkinson's disease with cognitive impairment // *Movement Disorders*. 2010. № 25(7). P. 2682–2685. doi: 10.1002/mds.23287.
9. Chen H., O'Reilly E., Schwarzschild M.A., Ascherio A., Peripheral Inflammatory Biomarkers and Risk of Parkinson's Disease // *American*

Journal of Epidemiology. 2008. № 167(1). P. 90–95. doi: 10.1093/aje/kwm260.

10. Пономарев В.В., Бойко А.В., Ионов О.А. Лабораторные биомаркеры ранней диагностики болезни Паркинсона // Международный неврологический журнал. 2016. № 3(81). С. 17–22.

УДК 612.433.018:543.51:543.544.5.0687

**Сяхович В.Э., Рута-Жуковская Е.Я., Лобода К.А.,
Бабарико Д.В., Бакакина Ю.С., Походня Ю.Г.**

*Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория»,
аг. Лесной, Республика Беларусь
rlab.head@antidoping.by*

ПОЛУЧЕНИЕ И ТАНДЕМНЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ ГЛАВНОЙ И МИНОРНОЙ ИЗОФОРМ ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

В работе проведен ферментативный гидролиз главной и минорной изоформ гормона роста человека с использованием ряда эндопротеаз. Наиболее интенсивные специфические и неспецифические пептиды были подвергнуты тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Выявлены характеристические MS/MS-пары данных пептидов для последующей разработки методики определения изоформ гормона роста.

Ключевые слова: *изоформы гормон роста человека, допинг-контроль, хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения.*

**Syakhovich V.E., Ruta-Zhukouskaia E.Ya., Loboda K.A., Babaryko D.V.,
Bakakina Y.S., Pakhadnia Yu.G.**

National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus

OBTAINING AND TANDEM MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF CHARACTERISTIC FRAGMENTS OF HUMAN GROWTH HORMONE MAJOR AND MINOR ISOFORMS

In this work, enzymatic hydrolysis of the major and minor isoforms of human growth hormone was carried out using a number of endoproteases. The most intense specific and non-specific peptides were subjected to high resolution tandem mass spectrometry. Characteristic MS/MS pairs of these

peptides were identified for the subsequent development of a method for the quantitative determination of growth hormone isoforms.

Keywords: *human growth hormone isoforms, doping control, high resolution chromatography — mass spectrometry.*

Введение. Гормон роста человека (ГРЧ) обладает анаболической активностью и опосредованно стимулирует синтез белков всего организма, включая белки скелетных мышц и коллаген, влияет на терморегуляцию, сердечную мышцу, объем крови и стимуляцию выработки эндорфинов. В связи с этим, ГРЧ получил широкое распространение как в медицинской практике для лечения различных вариантов соматотропной недостаточности, так и в спорте с целью повышения эффективности тренировочного процесса [1]. Использование ГРЧ в спорте отнесено к допингу (класс S2 Запрещенного списка «Всемирного антидопингового агентства») (ВАДА) [2].

Таким образом, разработка методики определения изоформного профиля гормона роста в крови человека с использованием методов протеомики для лабораторного этапа допинг-контроля является одним из приоритетных направлений научно-исследовательской деятельности ВАДА.

Цель исследования. Целью настоящего исследования было изучить пептидный профиль главной и минорной изоформ гормона роста человека, образующийся в результате действия ряда эндопротеаз, выявить и охарактеризовать специфические пептиды, которые могут быть использованы для идентификации данных форм ГРЧ, с применением tandemного масс-спектрометрического анализа.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись главная (22K-GH1) и минорная (20K-GH1) изоформы гормона роста человека (Thermo Scientific, США). Компьютерное моделирование пептидов ГРЧ проводили с использованием программного обеспечения Protein calculator (Thermo Scientific, США). Ферментативный гидролиз осуществляли с помощью эндопротеаз трипсин, GluC, AspN (Sigma, США) [3–5]. Анализ гидролизатов ГРЧ проводили методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения на сверхвысокоэффективном жидкостном хроматографе Dionex Ultimate 3000 с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США) с использованием обращенно-фазной колонки BioBasic C8 2,1 × 150 мм (5 мкм) (Thermo, США).

Результаты. *Выбор специфических пептидов для анализа содержания ГРЧ.* В ходе выполнения работы проведено моделирование пептидов главной (22K-GH1) и минорной (20K-GH1) изоформ ГРЧ,

образующихся в результате гидролиза с использованием эндопротеаз трипсин, GluC и AspN, а также комбинаций трипсин-GluC, трипсин-AspN.

При проведении трипсинолиза изоформ ГРЧ формируется ряд специфических пептидных последовательностей, которые также можно использовать для дифференциального определения данных белков: YSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNR (22K-GH1, пептид Т6), LHQLAFDITYQEFNPQTSLCFSESIPTPSNR (20K-GH1, пептид Т4). В качестве общих неспецифических пептидов в данном случае могут быть использованы LFDNAMLR, SNLELLR, SVFANSLVYGASDSNVYDLLK. Синтез, очистка и использование длинных пептидных последовательностей [6, 7], которые мы наблюдаем при триптическом гидролизе, являются довольно трудоемким процессом. В связи с этим, была изучена возможность использования специфических пептидов изоформ ГРЧ, образующихся под действие комбинации эндопротеаз.

Протеомный анализ гидролизатов 22K-GH1 и 20K-GH1 после обработки эндопротеазами трипсин-GluC показал образование широкого спектра пептидов среднего размера, а также значительную ионизацию как специфических пептидов YSFLQNPQTSLCFSE (22K-GH1, Т6G1), FNPQTSLCFSE (20K-GH1, Т4G2), так и неспецифических пептидов (LHQLAFDITYQE, SIPTPSNR, GIQTLMGR и др.). На рисунках 1 и 2 продемонстрированы хроматограммы разделения вышеописанных гидролизатов изоформ с экстракцией по массам ионов ключевых пептидов.

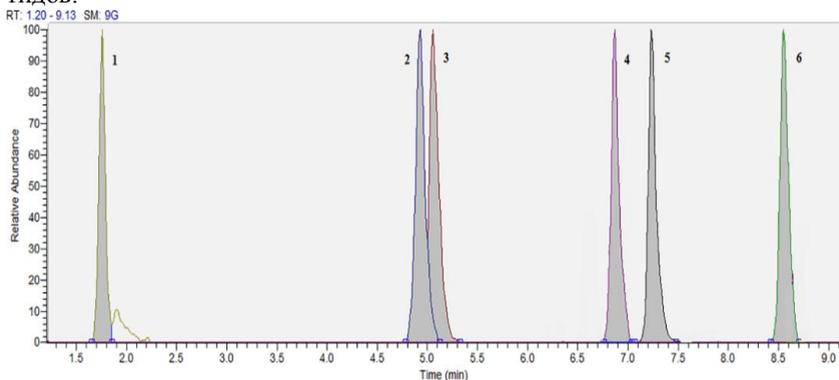


Рис. 1. Хроматограмма (нормализованная) пептидов изоформы 22K-GH1 гормона роста человека при гидролизе комбинацией эндопротеаз трипсин — GluC:

1) TQQK, экстракция по иону m/z 504,2776 (заряд +1);

- 2) SIPTPSNR, экстракция по иону m/z 871,4632 (заряд +1);
- 3) AYIPK, экстракция по иону m/z 591,3501 (заряд +1);
- 4) GIQTLMGR, экстракция по иону m/z 875,4767 (заряд +1);
- 5) LHQLAFDITYQE, экстракция по иону m/z 682,8276 (заряд +2);
- 6) **YSFLQNPQTSLCFSE**, экстракция по иону m/z 910,9116 (заряд +2)

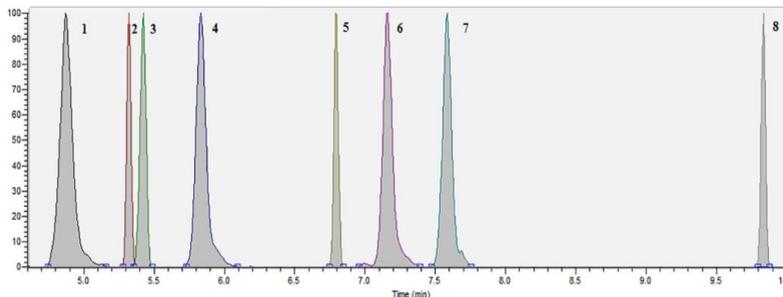


Рис. 2. Хроматограмма (нормализованная) пептидов изоформы 20K-GH1 гормона роста человека при гидролизе комбинацией эндопротеаз трипсин — GluC:

- 1) SIPTPSNR, экстракция по иону m/z 436,2352 (заряд +2);
- 2) DGSPR, экстракция по иону m/z 531,2522 (заряд +1);
- 3) GSCGF, экстракция по иону m/z 527,1918 (заряд +1);
- 4) TFLR, экстракция по иону m/z 536,3191 (заряд +1);
- 5) GIQTLMGR, экстракция по иону m/z 875,4767 (заряд +1);
- 6) LHQLAFDITYQE, экстракция по иону m/z 682,8276 (заряд +2);
- 7) **FNPQTSLCFSE**, экстракция по иону m/z 665,2926 (заряд +2);
- 8) ISLLLIQSWLE, экстракция по иону m/z 1314,7670 (заряд +1)

В то же время ферментативный гидролиз комбинацией трипсин-AspN тоже приводит к образованию крупных специфических пептидов YSFLQNPQTSLCFSES IPTPSNR (22K-GH1, T6A0), DTYQEFNPQTSLCFSES IPTPSNR (20K-GH1, T4A2) и неспецифических — DLEGIQTLMGR, DSNVY, DDALLK.

Тандемный масс-спектрометрический анализ. С целью селективной идентификации обеих изоформ ГРЧ изучен характер MC/MC-распада характеристических пептидов 22K-GH1 и 20K-GH1 и выявлены особенности образования дочерних ионов при различных условиях тандемного масс-спектрометрического анализа. В частности, было изучено влияние уровня энергии в коллизионной ячейке на характер фрагментации материнских ионов. На рисунках 3 и 4 представлены MC/MC-спектры специфических пептидов рассматриваемых изоформ,

образующихся при ферментативном гидролизе комбинацией эндопротеаз трипсин-GluC.

Для получения b- и y-серий дочерних ионов к родительским ионам была приложена коллизионная энергия со значениями 20, 25, 30 и 35 эВ. Ниже представлены гистограммы, демонстрирующие изменение интенсивности ряда дочерних ионов при увеличении значений энергии соударений (рис. 5).

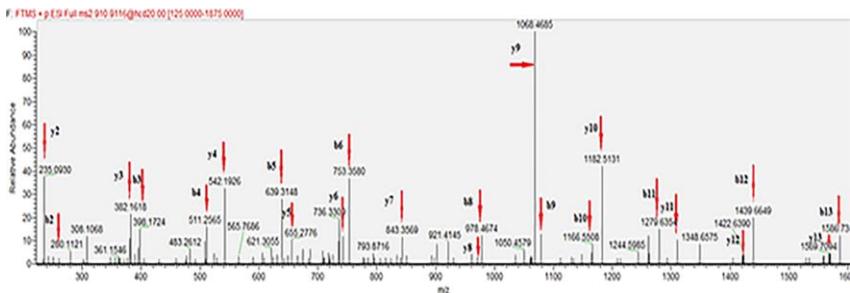


Рис. 3. MS/MS-спектр пептида YSFLQNPQTSLCFSE (T6G2) изоформы 22K-GH1 (экстракция по иону m/z 910,9116, заряд +2) (красные стрелки — b- и y-серии дочерних ионов)

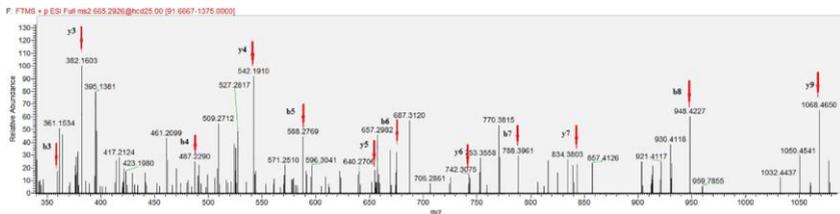


Рис. 4. MS/MS-спектр пептида FNPQTSLCFSE (T4G1) изоформы 20K-GH1 (экстракция по иону m/z 665,2926, заряд +2) (красные стрелки — b- и y-серии дочерних ионов)

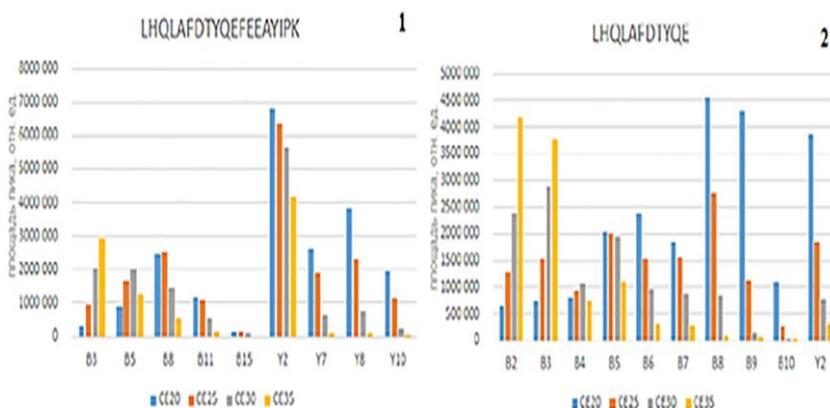


Рис. 5. Диаграммы изменения площадей наиболее интенсивных дочерних ионов изоформы ГРЧ 22K-GH1 при возрастании значений коллизонной энергии: 1 — пептид LHQLAFDITYQEFEEAYIPK (T4), 2 — пептид LHQLAFDITYQE (T4G1)

Проведенные исследования позволили выявить наиболее интенсивные и специфичные пары родительский-дочерний ион, которые можно использовать при разработке методики селективной детекции изоформ ГРЧ (табл. 1).

Таблица 1. Значения m/z и условий детекции дочерних ионов наиболее интенсивных специфических и неспецифических пептидов главной и минорной изоформ ГРЧ

	Пептид	Материнский ион, m/z	Коллизионная энергия, эВ	Дочерний пептид	Дочерние ионы, m/z	
	YSFLQNPQTSLC FSESIPTPSNR (22K-GH1)	1337,1343	CE25	PTPSNR	671,3471	
				PQTSLCFSE SIPTPSNR	1920,9120	
	LHQLAFDITYQEF NPQTSLCFSESIPTPSNR (20K-GH1)	1176,5560	CE25	PTPSNR	671,3471	
				LHQLAFDITYQEFN	1607,7488	
	LFDNAMLRL	490,2551	CE25	NAMLRL	604,3235	
				FDNAMLRL	866,4188	
	SNLELLRL	844,4887	CE30	SNL	315,1662	
				SNLE	444,2088	
	SVFANSLVYGAS DSNVYDLLK	1131,5680	CE30	GASDSNVY DLLK	1281,6321	
				YGASDSNV YDLLK	1444,6954	
	Эндопротеазы Трипсин и AspN	YSFLQNPQTSLC FSESIPTPSNR (22K-GH1)	1337,1343	CE25	PTPSNR	671,3471
					PQTSLCFSE SIPTPSNR	1920,9120
DITYQEFNPQTSLC FSESIPTPSNR (20K-GH1)		1409,6348	CE25	DITYQEFNP QT	1224,5167	
				PQTSLCFSE SIPTPSNR	1920,9120	
DLEEGIQTLMGR		1361,6729	CE30	GIQTLMGR	875,4767	
				LEEGIQTLM GR	1246,6459	
DDALLK		674,3719	CE30	LK	260,1969	
				DDA	302,0983	
				DDAL	415,1823	
DSNVY		597,2515	CE20	DSN	317,1092	
				DSNV	416,1776	
Эндопротеазы Трипсин и GluC		YSFLQNPQTSLC FSE (22K-GH1)	910,9116	CE20	YSFLQN	753,3566
	PQTSLCFSE				1068,4666	
	SE				235,0925	
	FNPQTSLCFSE (20K-GH1)	665,2926	CE25	CFSE	542,1915	
				PQTSLCFSE	1068,4666	
				SE	235,0925	
LHQLAFDITYQE	682,8276	CE20	QE	276,1190		

				LHQLAFDT	926,4730
				LHQLAFDT Y	1089,536
SIPTPSNR	871,4632	CE25		PTPSNR	671,3471
				IPTPSNR	784,4312
GIQTLMGR	875,4767	CE30		GIQ	299,1714
				GIQT	400,2191
				QTLMGR	705,3712

Следует отметить, что особенностью МС/МС-анализа масс-спектрометров высокого разрешения является детекция дочерних ионов в режиме полного сканирования. Изменение диапазона сканирования не влияет на интенсивность дочерних ионов, что позволяет даже в рутинном анализе для каждого родительского иона получать спектр дочерних. Анализ данного спектра значительно увеличивает специфичность определения характеристических пептидов.

Заключение. Таким образом, в данной работе изучены особенности тандемного масс-спектрометрического анализа характеристических пептидов, полученных при ферментативном гидролизе рядом эндопротеаз главной и минорной изоформ ГРЧ. Выявлены характеристические МС/МС-пары для данных пептидов, которые в последующем будут использованы при разработке методики количественного определения изоформ гормона роста в крови человека.

Список литературы

1. Schweizer J.R. de O.L. Growth hormone: isoforms, clinical aspects and assays interference / Júnia Ribeiro de Oliveira Longo Schweizer, Antônio Ribeiro-Oliveira Jr, Martin Bidlingmaier // *Clinical Diabetes and Endocrinology*. 2018. № 18.
2. World Anti-Doping Agency. The 2022 prohibited list [Electronic resource]. Mode of access: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2022list_en.pdf. Date of access: 17.08.2022.5.
3. Judák P. Doping control analysis of small peptides: A decade of progress / Péter Judák, Simone Esposito, Gilles Coppieters, Peter Van Eenoo, Koen Deventer // *Journal of Chromatography*. 2021. Vol. 1173. № 122551.
4. Shatat S.M., Basma M. Eltanany, Abeer A Mohamed, Medhat A. Al-Ghobashy, Faten A Fathalla, Samah S Abbas Coupling of on-column trypsin digestion–peptide mapping and principal component analysis for stability and biosimilarity assessment of recombinant human growth hormone // *Journal of Chromatography*. 2018. Vol. 1072. P. 105–115.

5. Chrisman P., Chrisman P.A., Pitteri S.J., McLuckey S.A. Parallel ion parking: Improving conversion of parents to first-generation products in electron transfer dissociation // *Analytical Chemistry*. 2005. Vol. 77. № 10. P. 3411–3414.

6. Arsene C. Dirk Schulze, Anita Röthke, Mario Thevis, André Henrion Growth hormone isoform-differential mass spectrometry for doping control purposes // *Drug Testing and Analysis*. 2018. Vol. 10(6). P. 938–946.

7. Setner B. Bartosz Setner, Piotr Stefanowicz, Zbigniew Szewczuk Quaternary ammonium isobaric tag for a relative and absolute quantification of peptides // *Journal of Mass Spectrometry*. 2018. Vol. 52(2). P. 115–123.

УДК 577.17

**Фокина Е.А.,¹ Деркач К.В.,¹ Сорокоумов В.Н.,² Бахтюков А.А.,¹
Морина И.Ю.,¹ Шпаков А.О.¹**

¹ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова Российской академии наук»,

²Институт химии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет»,

Санкт-Петербург, Россия
fokina-katrina@yandex.ru

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ
РАЗЛИЧНЫХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА
ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА ОВАРИАЛЬНЫЙ
СТЕРОИДОГЕНЕЗ У НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМОК КРЫС**

Низкомолекулярный аллостерический агонист рецептора лютеинизирующего гормона ТПОЗ по способности индуцировать овуляцию и повышать уровень прогестерона у неполовозрелых самок крыс сходен с хорионическим гонадотропином человека, но при этом, в отличие от гонадотропина, не усиливает экспрессию VEGF-B в яичниках, что снижает вероятность развития синдрома гиперстимуляции яичников.

Ключевые слова: овариальный стероидогенез, неполовозрелые самки, тиенопиримидин, гонадотропин, лютеинизирующий гормон.

**Fokina E.A.¹, Derkach K.V.¹, Sorokoumov V.N.², Bakhtyukov A.A.¹,
Morina I.Y.¹, Shpakov A.O.¹**

¹ *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

² *Institute of Chemistry,
St. Petersburg State University,
St. Petersburg, Russia*

COMPARATIVE STUDY OF THE REGULATORY EFFECTS OF DIFFERENT LUTHEINIZING HORMONE RECEPTOR AGONISTS ON OVARIAN STEROIDOGENESIS IN IMMATURE FEMALE RATS

The TP03, a low-molecular-weight allosteric agonist of luteinizing hormone receptor, is similar in its ability to induce ovulation and increase the level of progesterone in immature female rats to human chorionic gonadotropin, but, unlike gonadotropin, it does not increase the expression of VEGF-B in the ovaries, which reduces the likelihood of developing ovarian hyperstimulation syndrome.

Keywords: *ovarian steroidogenesis, immature females, thienopyrimidine, gonadotropin, luteinizing hormone.*

Введение. Разработка эффективных стратегий индукции овуляции, в том числе в рамках вспомогательных репродуктивных технологий, является одной из актуальных проблем современной эндокринологии и репродуктивной медицины. Используемые в настоящее время для этой цели препараты гонадотропинов — рекомбинантный лютеинизирующий гормон (ЛГ) и рекомбинантный и мочевого хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) — не лишены ряда существенных недостатков [1]. Так они способны вызывать синдром гиперстимуляции яичников, что обусловлено избыточной активацией рецепторов ЛГ в фолликулярных клетках и повышением экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), а также наделены онкогенным потенциалом, что вызвано различиями в эффекторной специфичности у природных гонадотропинов и их фармакологических препаратов [2–4]. Вследствие этого ведется поиск альтернативных путей индукции овуляции, для чего могут быть использованы низкомолекулярные соединения гетероциклической природы, наделенные свойствами аллостерических регуляторов рецептора ЛГ [2]. Наибольшей активностью среди них характеризуются тиенопиримидиновые производные, в том числе соединение Org43553 [5]. Нами ранее также начата разработка тиенопиримидиновых производных, которые продемонстрировали стероидогенный эф-

фekt при введении самцам крыс, в том числе с метаболическими расстройствами [6, 7]. Важно, что этот эффект был умеренно выражен, что исключает гиперактивацию стероидогенных путей, и устойчив во времени, что указывает на отсутствие, в отличие от гонадотропинов, развития резистентности тканей-мишеней к действию низкомолекулярных аллостерических агонистов рецептора ЛГ [6, 7]. Однако активность созданных нами производных не была изучена в отношении овариального стероидогенеза, что крайне важно для расширения фармакологического спектра их применения.

Цель работы состояла в сравнительном изучении влияния ТПО3, наиболее активного аналога агониста рецептора ЛГ, и ХГЧ на компоненты овариального стероидогенеза у неполовозрелых самок крыс, а также на экспрессию VEGF в яичниках.

Материал и методы. В опытах использовали самок крыс линии Wistar возраста 22–24 дня, которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. Все процедуры с животными осуществляли, следуя требованиям Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Для индукции фолликулогенеза использовали гонадотропин сыворотки жеребых кобыл Фоллимаг («Мосагrogen», Россия) (п/к, 15 МЕ/крысу). Спустя 48 ч вводили индукторы овуляции — ХГЧ (п/к, 15 МЕ/крысу) или ТПО3 (в/б, 50 мг/кг). После введения ХГЧ и ТПО3 через 4, 8, 16 или 24 ч у животных забирали влагалищные мазки для дальнейшей микроскопии. Затем крыс подвергали анестезии (хлоральгидрат, 400 мг/кг, в/б) и после декапитации забирали яичники, взвешивали их, морфологически оценивали число созревших фолликулов и экспрессию целевых генов. Из шейных вен забирали цельную кровь для определения уровня стероидных гормонов. Формировали следующие 11 групп (во всех n=5): Контроль (К), Фоллимаг 48 ч (ФМГ-48) или 64 ч (ФМГ-64), а также группы с обработкой ХГЧ (ФМГ-ХГЧ-4, ФМГ-ХГЧ-8, ФМГ-ХГЧ-16, ФМГ-ХГЧ-24) или ТПО3 (ФМГ-ТП-4, ФМГ-ТП-8, ФМГ-ТП-16, ФМГ-ТП-24) продолжительностью 4, 8, 16 и 24 ч, соответственно. Уровни эстрадиола и прогестерона определяли с помощью ИФА анализа, используя наборы «Эстрадиол-ИФА» и «Прогестерон-ИФА» («ХЕМА», Россия). Тотальную РНК из яичников выделяли с помощью реагента «ExtractRNA» («Евроген, Россия), затем проводили обратную транскрипцию для получения кДНК с помощью набора «MMLV RT Kit» («Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе «Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System» («Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.», США) в

смеси, содержащей 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, используя реагент «qPCR-HS SYBR+Low ROX» («Евроген, Россия). Последовательности праймеров были описаны ранее [6], в качестве референсного гена использовали ген *Actb*. Статистический анализ проводили с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007» (США), результаты представляли в виде $M \pm SEM$. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Удельная масса яичников существенно повышалась в группах, обработанных Фоллимагом, в том числе в группах с обработкой ТПО3 и ХГЧ (табл. 1).

Таблица 1. Удельная масса яичников и овариальные уровни эстрадиола и прогестерона у неполовозрелых крыс с различными схемами индукции овуляции

Группа животных	Удельная масса яичников, %	Прогестерон, нмоль/л	Эстрадиол, нмоль/л
К	0,020±0,002	20,9±3,7	0,19±0,03
ФМГ-48	0,046±0,004 ^a	12,3±1,7	1,20±0,18 ^a
ФМГ-64	0,043±0,003 ^a	14,3±3,0	0,35±0,07 ^b
ФМГ-ХГЧ-4	0,066±0,005 ^{a,b}	26,6±1,9 ^b	1,12±0,09 ^a
ФМГ-ХГЧ-8	0,059±0,010 ^a	101,0±14,0 ^{a,b}	0,20±0,04 ^b
ФМГ-ХГЧ-16	0,078±0,005 ^{a,b}	63,0±10,9 ^{a,b}	0,19±0,04 ^b
ФМГ-ХГЧ-24	0,060±0,004 ^{a,b}	11,3±3,1	0,33±0,09 ^b
ФМГ-ТП-4	0,042±0,002 ^a	14,6±2,8	1,06±0,08 ^a
ФМГ-ТП-8	0,037±0,002 ^a	42,2±6,0 ^{a,b}	0,36±0,05 ^{a,b}
ФМГ-ТП-16	0,065±0,006 ^{a,b}	18,8±0,9 ^b	0,39±0,06 ^{a,b}
ФМГ-ТП-24	0,054±0,003 ^a	10,6±1,4 ^a	0,46±0,07 ^{a,b}

Примечание. Удельную массу яичников рассчитывали, как соотношение массы левого и правого яичников к таковой массе тела животных, выражая в процентах. Различия значимы при $p < 0,05$: ^a с группой «К», ^b с группой «ФМГ-48». Данные представлены как $M \pm SEM$, $n=5$ в каждой группе.

Морфологический анализ яичников показал, что в группах ФМГ-ХГЧ-24 и ФМГ-ТП-24, но не в группах без обработки индукторами овуляции, имелись подвергшиеся овуляции фолликулы — $16,6 \pm 1,2$ и $8,6 \pm 0,5$, соответственно. Исследование стероидогенного профиля при введении ХГЧ и ТПОЗ показало, что как ХГЧ, так и ТПОЗ значительно повышают уровень прогестерона через 8 ч после обработки, причем эффект ХГЧ выражен намного сильнее и выявляется также через 16 ч (см. табл. 1). В случае эстрадиола его уровень в яичниках, напротив, снижался в сравнении с таковым в группе ФМГ-48, причем существенно быстрее в группах с обработкой ХГЧ (см. табл. 1).

Эти данные в совокупности указывают на то, что ХГЧ и ТПОЗ сходным образом ведут себя, как индукторы овуляции, но действие ХГЧ выражено в большей степени, что, однако, нельзя рассматривать как его преимущество, поскольку высокая эффективность может стать причиной нежелательной гиперактивации яичников, истощения овариального резерва и снижения качества яйцеклеток [1].

На следующем этапе в яичниках крыс оценивали экспрессию гена *Star*, кодирующего холестерин-транспортирующий белок StAR, контролирующей начальную скорость-лимитирующую стадию стероидогенеза, а также генов *VegfA* и *VegfB*, кодирующих VEGF A- и B-подтипа. Показано, что экспрессия гена белка StAR существенно не меняется в группах, обработанных только Фоллимагом, в то время как индукторы овуляции ХГЧ и ТПОЗ в значительной степени ее ингибируют (см. табл. 2).

Поскольку через 4 ч обработки ХГЧ и ТПОЗ повышен не только уровень эстрадиола, но и начинается подъем уровня прогестерона, достигающий максимума через 8 ч, то сильно выраженное снижение экспрессии гена *Star* может быть обусловлено запуском механизма отрицательных обратных связей, направленных на компенсаторное ослабление овариального стероидогенеза. Экспрессия генов, кодирующих VEGF-A и VEGF-B, в группах «ФМГ-48» и «ФМГ-64» снижалась, в большей степени в случае гена *VegfB* (см. табл. 2).

ХГЧ и ТПОЗ сравнительно слабо влияли на уровень экспрессии гена *VegfA*, сохраняя низкой ее уровень, достигнутый при обработке ФСГ. Исключение составила временная точка 24 ч, в которой оба агониста рецептора ЛГ значительно ингибировали экспрессию гена *VegfA* (см. табл. 2).

Иную картину отмечали для экспрессии *VegfB* — ХГЧ повышал ее в среднем в 3 раза в сравнении с группой «ФМГ-48», в то время как ТПОЗ, влиял на нее слабо, в небольшой степени повышая ее во временной точке 16 ч (см. табл. 2).

Таблица 2. Экспрессия генов, кодирующих транспортный белок StAR и ростовые факторы VEGF-A и VEGF-B, в яичниках неполовозрелых крыс с различными схемами индукции овуляции

Группа животных	Star	VegfA	VegfB
	RQ, относительные единицы		
К	1,04±0,09	1,03±0,09	1,04±0,08
ФМГ-48	0,86±0,07	0,67±0,11	0,51±0,08 ^a
ФМГ-64	0,70±0,10	0,53±0,10 ^a	0,38±0,11 ^a
ФМГ-ХГЧ-4	0,13±0,02 ^{a,b}	0,41±0,11 ^a	1,66±0,07 ^{a,b}
ФМГ-ХГЧ-8	0,12±0,02 ^{a,b}	0,28±0,08 ^a	1,62±0,05 ^{a,b}
ФМГ-ХГЧ-16	0,22±0,04 ^{a,b}	0,42±0,09 ^a	1,67±0,11 ^{a,b}
ФМГ-ХГЧ-24	0,08±0,02 ^{a,b}	0,19±0,05 ^{a,b}	1,58±0,08 ^{a,b}
ФМГ-ТП-4	0,10±0,02 ^{a,b}	0,51±0,08 ^a	0,93±0,08
ФМГ-ТП-8	0,11±0,03 ^{a,b}	0,80±0,13	0,91±0,12
ФМГ-ТП-16	0,55±0,05 ^a	0,52±0,07 ^a	1,29±0,12 ^b
ФМГ-ТП-24	0,27±0,04 ^{a,b}	0,09±0,03 ^{a,b}	0,42±0,08 ^a

Примечание. Различия значимы при $p < 0,05$: ^a — с группой «К», ^b — с группой «ФМГ-48». Данные представлены как $M \pm SEM$, $n=5$ в каждой группе.

Эти данные свидетельствуют о том, что, несмотря на сравнительно низкую дозу ХГЧ в течение суток после стимуляции овуляции поддерживает высокий уровень экспрессии VEGF-B, в то время как ТПО3 существенно на нее не влияет. Повышенный уровень VEGF является одним из маркеров высокого риска развития синдрома гиперстимуляции яичников [8].

Сделан вывод, что по стероидогенной активности и способности индуцировать овуляцию у неполовозрелых самок крыс аллостерический агонист ТПО3 сопоставим с ХГЧ. При этом, в отличие от ХГЧ, он не усиливает экспрессию VEGF-B в яичниках, что снижает вероятность развития синдрома гиперстимуляции яичников, ассоциированного с VEGF-сигнальными путями.

Работа поддержана Российским научным фондом (№ 19-75-20122).

Список литературы

1. Martinez F., Racca A., Rodríguez I., Polyzos N.P Ovarian stimulation for oocyte donation: a systematic review and meta-analysis // Hum Reprod Update. 2021. Vol. 27. № 4. P. 673–696.
2. Casarini L., Simoni M. Recent advances in understanding gonadotropin signaling // Fac Rev. 2021. Vol. 10.

3. Shen X., Yang Q., Li L., Lu W. Clinical Pregnancy and Incidence of Ovarian Hyperstimulation Syndrome in High Ovarian Responders Receiving Different Doses of hCG Supplementation in a GnRH-Agonist Trigger Protocol // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021. Vol. 2021. P. 1–7.

4. Huang J., Mao Y., Li Q., Hong H., Tang N., Kang X., Huang Y., Liu J., Gong Q., Yao Y., Li L. Kallistatin prevents ovarian hyperstimulation syndrome by regulating vascular leakage // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2022. Vol. 26. № 16. P. 4613–4623.

5. van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M.J., Hanssen R.G. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008. Vol. 378. № 5. P. 503–514.

6. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Gureev M.A., Dar'in D.V., Sorokoumov V.N., Romanova I.V., Morina I.Y., Steepochkina A.M., Shpakov A.O. Comparative Study of the Steroidogenic Effects of Human Chorionic Gonadotropin and Thieno [2,3-D] pyrimidine-Based Allosteric Agonist of Luteinizing Hormone Receptor in Young Adult, Aging and Diabetic Male Rats // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. № 20. P. 74–93.

7. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Sorokoumov V.N., Steepochkina A.M., Romanova I.V., Morina I.Y., Zakharova I.O., Bayunova L.V., Shpakov A.O. The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 23. № 1. P. 198.

8. Kwik M., Maxwell E. Pathophysiology, treatment and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome // *Curr Opin Obstet Gynecology*. 2016. Vol. 28. № 4. P. 236–241.

УДК 542.957:547.7:547.854:547.857:615.27.3

Чигасова А.К., Островская Л.А., Корман Д.Б.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,

Москва, Россия

Annagrekhova1@gmail.com

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО И ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАКРИЛАТА ЗОЛОТА

Исследовано действие полиакрилата золота (аурумакрил) на клетки рака молочной железы (MCF-7) in vitro. Полиакрилат золота обладает выраженным цитотоксическим и цитостатическим действием, вызывая гибель клеток и снижая пролиферативную активность выжившей фракции опухолевых клеток. Генотоксическое действие полиакрилата золота на опухолевые клетки связано с индукцией сшивок в молекуле ДНК.

Ключевые слова: полиакрилат золота, клетки рака молочной железы (MCF-7), гибель клеток, сшивки ДНК, клеточная пролиферация.

Chigasova A.K., Ostrovskaya L.A., Korman D.B.

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

THE STUDY OF THE AURUM POLYACRYLATE CYTOTOXIC AND GENOTOXIC MECHANISM OF ACTION

The effect of aurum polyacrylate (aurumacryl) on breast cancer cells (MCF-7) in vitro was studied. Aurum polyacrylate has a pronounced cytotoxic and cytostatic effect, causing cell death and reducing the proliferative activity of the surviving fraction of tumor cells. The genotoxic effect of aurum polyacrylate on tumor cells is associated with the induction of crosslinks in the DNA molecule.

Keywords: Aurum polyacrylate, breast cancer cells (MCF-7), cell death, DNA crosslinks, cell proliferation.

Изучение механизмов действия металлорганических соединений в качестве противоопухолевых препаратов является одним из перспективных направлений исследований в области биомедицинской химии, а также экспериментальной и клинической онкологии. При этом особое внимание уделяется исследованию веществ, содержащих золото, как в виде наночастиц, так и в виде комплексных соединений [1-3]. Важно отметить, что некоторые соединения на основе золота

проявляют противоопухолевую активность в отношении экспериментальных опухолей с приобретенной резистентностью к препаратам платины [4].

Среди биологически активных золотосодержащих соединений особый интерес представляет полиакрилат золота (аурумакрил) — препарат на основе полиакриловой кислоты, синтезированный под руководством академика М.Г. Воронкова в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН и проходящий доклиническое исследование в качестве потенциального противоопухолевого агента в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН.

Аурумакрил проявляет значительную противоопухолевую активность на моделях солидных опухолей животных (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Ca-755) *in vivo*, обладает цитотоксической эффективностью в отношении клеточных линий опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A-549, рак толстой кишки HCT116, меланома Mel Me) *in vitro* [5], не имеет перекрестной резистентности с широко применяющимися цитостатиками — цисплатиной и доксорубицином (культура MCF-7) [6].

Цель исследования. Изучение механизма цитотоксического действия аурумакрила *in vitro* в отношении клеток карциномы молочной железы человека линии MCF-7.

Материалы и методы. Исследуемое соединение — полиакрилат золота — представляет собой неполную золотую соль полиакриловой кислоты, содержащей 8,03 масс. % Au, и отвечает общей формуле: $(-CH_2-CHCOOH-)_n(-CH_2CHCOO AuCl_3H-)_m$, где $n=1263$; $m=124$.

Механизм действия полиакрилата золота исследован в условиях *in vitro* при применении препарата в виде водного раствора в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 0,001 до 1,0 мг/мл. Инкубация клеток с препаратом проводили при 37 °С в течение 1, 6 и 24 часов, при параллельном инкубировании интактных клеток в качестве контроля.

Экспериментальной моделью служила культуры клеток карциномы молочной железы человека MCF-7.

Культивирование клеток проводили в стандартной культуральной среде DMEM/F12 («Life Technologies Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия), 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 10% FBS («Life Technologies Thermo Fisher Scientific», США) путем термостатирования при 37°С в 5% CO₂ (MCO-18AC, «Sanyo», Япония). Экспериментальное изучение полиакрилата золота проведено на клетках, на-

ходящихся в фазе экспоненциального роста (плотность клеточной популяции ~ 70%).

Для оценки жизнеспособности клеток использовали 0,4% раствор трипанового синего, который не проникает сквозь мембраны интактных клеток, а избирательно окрашивает только погибшие клетки. В анализе использовали 500 клеток для каждой точки.

Для определения пути гибели клеток линии MCF-7 после воздействия полиакрилата золота использовали метод оценки доли апоптотических клеток среди всех погибших клеток с помощью ДНК-связывающего флуоресцентного красителя YO-PRO-1 из коммерческого набора «Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4» («Invitrogen», США). Краситель YO-PRO-1 избирательно проникает через мембрану только апоптотических клеток, после чего клетки начинают флуоресцировать в зеленой области спектра. Добавление йодистого пропидия позволяет дифференцировано окрасить погибшие клетки, флуоресцирующие после окраски в красной области спектра. Через мембрану живых клеток эти красители не проникают.

Для оценки влияния полиакрилата золота на клеточную пролиферацию проводили иммуноцитохимический анализ маркера клеточного деления — белка Ki-67. Этот белок Ki67 экспрессируется в клетках, находящихся на стадиях интерфазы (G1, S, G2) и митоза (M), так называемых Ki67 позитивных клетках (Ki67+), и отсутствует во время фазы G0 в Ki67 негативных клетках (Ki67-) [7].

Оценку двунитевых разрывов ДНК проводили иммуноцитохимическим методом при помощи антител, специфичных к белку-маркеру двунитевых разрывов ДНК — фосфорилированному гистону H2AX (γ H2AX). Клетки на покровных стеклах в чашках Петри (35 мм) отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (PBS) (pH 7,4) и фиксировали параформальдегидом (4%-й раствор в PBS, pH 7,4) в течение 15 мин при комнатной температуре. Пермеабилizировали 0,3%-м тритоном X-100 в PBS (pH 7,4), содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина, для блокирования неспецифического связывания. Слайды инкубировали с кроличьими моноклональными антителами к белку γ H2AX (Anti-phospho-Histone H2A.X Rabbit Monoclonal, Merck-Millipore, США) и с мышинными моноклональными антителами к белку Ki-67 (Anti-Ki-67, Merck-Millipore, США), разведенными в соотношении 1/200 в PBS (pH 7,4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина, в течение 60 мин при комнатной температуре. После двукратной промывки в PBS (pH 7,4) слайды инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом родамин (Goat

anti-Rabbit IgG(H+L) Rhodamine conjugate, Merck-Millipore, США) и с вторичными козыми поликлональными антителами к мышиному Ig G с красителем Alexa 488 (Merck-Millipore, США), разведенными в соотношении 1/400 в PBS (pH 7,4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. Для окраски ДНК и предотвращения фотоблещивания использовали заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США), содержащую DAPI. Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе «Eclipse Ni-U» (Nikon, Япония) с использованием наборов светофильтров DAPI (возбуждение на 340–380 нм и эмиссия на 435–485 нм) и B-2E/C (возбуждение на 465–495 нм и эмиссия на 515–555 нм). Для подсчета количества фокусов γ H2AX использовали программу DARFI [8]. Анализировали 200–500 клеток на точку, после чего подсчитывали долю Ki-67-позитивных/Ki-67-негативных клеток.

Изучение сшивок ДНК, индуцированных полиакрилатом золота проводили путем детектирования сшивок ДНК с использованием метода ДНК-комет в щелочных условиях. Клетки инкубировали с полиакрилатом золота в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкг/мл в течение 60 мин при 37 °С. Затем клетки дважды отмывали от среды PBS (pH 7,4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспензию, содержащую $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Суспензию контрольных или обработанных полиакрилатом золота клеток смешивали с 1% раствором легкоплавкой агарозы при 37,5°C (1:1) и наносили по 75 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1% раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали 10 минут при 4 °С. Затем в течение 60 мин клетки подвергали лизису при 4 °С (лизирующий буфер: 2,5 моль/л NaCl; 20 ммоль/л Трис-HCl; 100 ммоль/л Na2ЭДТА; 10% ДМСО; 1% Triton-X100) и щелочной денатурации с последующим проведением электрофореза (раствор для щелочной денатурации и электрофореза: 100 ммоль/л NaOH; 1 ммоль/л Na2ЭДТА, pH 12,5; стабилизация по напряжению — 2 В/см; 20 минут при 4 °С) и с дальнейшей нейтрализацией в течение 3–5 минут в 0,4 моль/л Трис-HCl буфере при 4 °С. Для окраски ДНК использовали акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4). Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе «Nikon Eclipse Ni-U» («Nikon», Япония). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу «CASP 1.2.2» («CASPlab»).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «Statistica 8.0» (StatSoft). Результаты представ-

лены как среднее из пяти независимых результатов \pm стандартная ошибка.

Результаты и их обсуждение. Полиакрилат золота обладает цитотоксическим действием на клетки линии MCF-7, вызывая их гибель (табл. 1).

Таблица 1. Гибель клеток культуры MCF-7 в зависимости от концентрации и времени воздействия полиакрилата золота

Концентрация полиакрилата золота, мг/мл	Гибель клеток, %		
	1 ч	6 ч	24 ч
0	6,6 \pm 1,17	7,75 \pm 1,38	11,42 \pm 2,48
0,001	9,75 \pm 0,63	11,3 \pm 1,7	12,5 \pm 3,59
0,01	12,4 \pm 2,16	12,8 \pm 2,51	18,92 \pm 4,75
0,1	14,6 \pm 3,97	18,7 \pm 4,78	23 \pm 6,63
1	24,4 \pm 6,73	27 \pm 4,86	61 \pm 12,2

Выраженность гибели клеток зависит от времени воздействия препарата и его концентрации. Максимальный эффект наблюдался после воздействия полиакрилата золота в концентрации 1 мг/мл: через час регистрировалось около 25% нежизнеспособных клеток, а через 24 часа 61%.

Анализ определения пути гибели клеток линии MCF-7 после действия на них полиакрилата золота показал, что с увеличением времени инкубации клеток MCF-7 с 1 часа до 24 часов наблюдается закономерное снижение доли апоптотических клеток среди погибших клеток для всех исследуемых концентраций полиакрилата золота. Полученные данные позволяют предположить, что гибель клеток, индуцированная полиакрилатом золота, может идти по другому пути, например, через митотическую катастрофу.

Под воздействием полиакрилата золота меняется пролиферативная активность выжившей фракции опухолевых клеток. При применении препарата в концентрации 1 мг/мл на протяжении 24 ч доля пролиферирующих клеток снижается с 60%, регистрируемых в это время в контроле, до 7% (рис. 1).

При изучении действия полиакрилата золота на ДНК опухолевых клеток установлена способность препарата индуцировать сшивки ДНК при отсутствии существенного влияния на образование двунитевых

разрывов ДНК. Инкубация клеток МСF-7 с полиакрилатом золота в концентрации 0,5 мг/мл в течение 1 часа снижает долю ДНК в хвосте ДНК-комет ~ 4 раза.

Таким образом, показано, что полиакрилат золота (аурумакрил) обладает выраженным цитотоксическим и цитостатическим действием, вызывая гибель клеток (около 60%) и снижая пролиферативную активность выжившей фракции опухолевых клеток. Генотоксическое действие препарата на опухолевые клетки связано с индуцированием сшивок в молекуле ДНК.

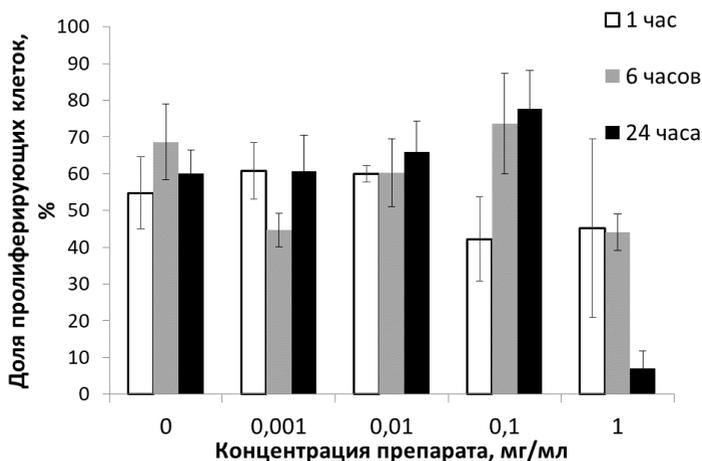


Рис. 1. Изменение доли пролиферирующих клеток культуры МСF-7 в зависимости от дозы и времени воздействия полиакрилата золота

Список литературы

1. Babaei A., Mousavi S.M., Ghasemi M., Pirbonyeh N., Soleimani M., Moattari A. Gold nanoparticles show potential *in vitro* antiviral and anticancer activity // *Life Sci.* 2021. Vol. 284. P. 119–652. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119652.
2. Kostova I. Gold coordination complexes as anticancer agents // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2006. Vol. 6. № 1. P. 19–32. doi: 10.2174/187152006774755500.
3. Корман Д.Б., Островская Л.А., Кузьмин В.А. Золотосодержащие комплексные соединения — противоопухолевые свойства, мишени и механизмы действия (обзор) // *Вопросы онкологии.* 2018. Т. 64. № 6. С. 697–707.
4. Altaf M., Monim-Ul-Mehboob M., Kawde A.-N., Corona G., Larcher R., Ogasawara M., Casagrande N., Celegato M., Borghese C., Siddik Z.H., Aldinucci D., Isab A.A. New bipyridine gold (III) dithiocarbamate-containing complexes exerted a potent anticancer activity against cisplatin-resistant cancer cells independent of p53 status // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8. № 1. P. 490–505. doi:10.18632/oncotarget.13448.
5. Островская Л.А., Корман Д.Б., Блюхтерова Н.В., Фомина М.М., Рыкова В.А., Чигасова А.К., Некрасова Е.И., Абзаева К.А., Рябая О.О., Бурмий Ж.П. Полиакрилат золота: экспериментальное изучение противоопухолевой активности // *Российский биотерапевтический журнал,* 2020. Т. 19. № 4. С. 74–85. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-74-85.
6. Островская Л.А., Корман Д.Б., Некрасова Е.И., Хоченкова Ю.А., Блюхтерова Н.В., Абзаева К.А. Полиакрилаты благородных металлов — цитотоксичность в отношении резистентных к цисплатине и доксорубину опухолевых клеток // *Биофизика.* 2022. Т. 67. № 5, гранки.
7. Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., Schwab U., Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 // *Journal Immunol.* 1984. Vol 133. № 4. P. 1710–1715.
8. Озеров И.В. Математическое моделирование процессов индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках млекопитающих при действии редкоионизирующего излучения с различной мощностью дозы: автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук: 03.01.01. М., 2015. 25 с.

Для заметок

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
3-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ**

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

**ПОСВЯЩЕННОЙ 110-ЛЕТИЮ ДОКТОРА
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК, ПРОФЕССОРА А. П. БРЕСТКИНА**

**Санкт-Петербург
1–2 декабря 2022 года**

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

Часть 1

Технический редактор: *Т.Н. Ефимова*

Подписано в печать 14.11.2022 г. Формат бумаги 60×84/16.
Уч.-изд. л. 16,1. Усл. печ. л. 22,0. Заказ № 334 (1)

Санкт-Петербург, Издательство ФГБОУ ВО
СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России
191015, Санкт-Петербург, Кирочная ул., д. 41.

Отпечатано в типографии ФГБОУ ВО
СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России
191015, Санкт-Петербург, Кирочная ул., д. 41.