СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

1945 2015 ПОБЕДА! 70 ЛЕТ

Краевой фонд науки
Основан в 1992 году

ПРОСПЕКТ СВОБОДНЫЙ-2015

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ СТУДЕНТОВ,
АСПИРАНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

ЭЛЕКТРОННЫЙ СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ СТУДЕНТОВ, АСПИРАНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ **«ПРОСПЕКТ СВОБОДНЫЙ-2015»**, ПОСВЯЩЕННОЙ 70-ЛЕТИЮ ВЕЛИКОЙ ПОБЕДЫ

КРАСНОЯРСК, СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
15-25 АПРЕЛЯ 2015 Г.

Министерство образования и науки Российской федерации
ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет»

Сборник материалов Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Проспект Свободный-2015», посвященной 70-летию Великой Победы

Красноярск, Сибирский федеральный университет, 15-25 апреля 2015 г.

Красноярск, 2015.

«Медицинская биология и биотехнология»

УДК 616-092.4

ПОКАЗАТЕЛИ КИСЛОТНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ И УРОВЕНЬ ГОРМОНА ЭСТРАДИОЛА У ЛЮДЕЙ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Абросимова Е. С, Китаева В. О,
научный руководитель канд. биол. наук Гершкорон Ф. А.
Сибирский Федеральный Университет
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра Медицинской биологии

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) – широко распространенное заболевание, являющееся одной из основных причин смерти, временной и стойкой утраты трудоспособности населения во всех развитых странах мира. В Российской Федерации заболеваемость и смертность от ИБС одни из самых высоких в мире [1].

Система крови входит в состав ключевых гомеостатических структур организма, которые быстро реагируют на действие экстремальных факторов и играют важную роль в процессе развития краткосрочной и долговременной адаптации. Одной из главных функций кроветворной ткани является транспорт кислорода, углекислого газа и биоактивных веществ к исполнительным органам и клеткам с помощью эритроцитов, без которых жизнедеятельность организма невозможна [2].

Эстрогены являются одним из компонентов стресс-реакции. Эстрогены играют важную роль в регуляции многих биохимических процессов: участвуют в углеводном обмене, в распределении липидов, стимулируют синтез аминокислот, нуклеиновых кислот и белков, способствуют отложению кальция в костной ткани, задерживают выделение из организма натрия, неорганического фосфора и воды [3].

Целью данной работы стало исследование кислотной резистентности эритроцитов крови и уровня гормона стресс-реакции эстрадиола у людей с ишемической болезнью сердца.

Для определения кислотной резистентности эритроцитов использовали метод химических (кислотных) эритрограмм Терскова-Гительзона [4]. Для определения концентрации эстрадиола проводили иммуноферментный анализ с использованием моноклональных антител.

Эритрограмма здорового человека имеет пик гемолиза на 3-3,5 минуте, начало на 1,5-2 минуте и окончание на 6,5-7,5 минуте. Количество повышеностойких эритроцитов возрастом 28-30 дней у здоровых людей составляет 20-25 %, количество эритроцитов со средней стойкостью возрастом 30-90 дней составляет 45-55 % и количество эритроцитов с низкой

стойкостью составляет 20-25 %, их возраст более 90 дней.

При анализе кислотной резистентности красных клеток крови у больных ишемической болезнью сердца наблюдается увеличение кислотной устойчивости эритроцитов (Рис. 1).

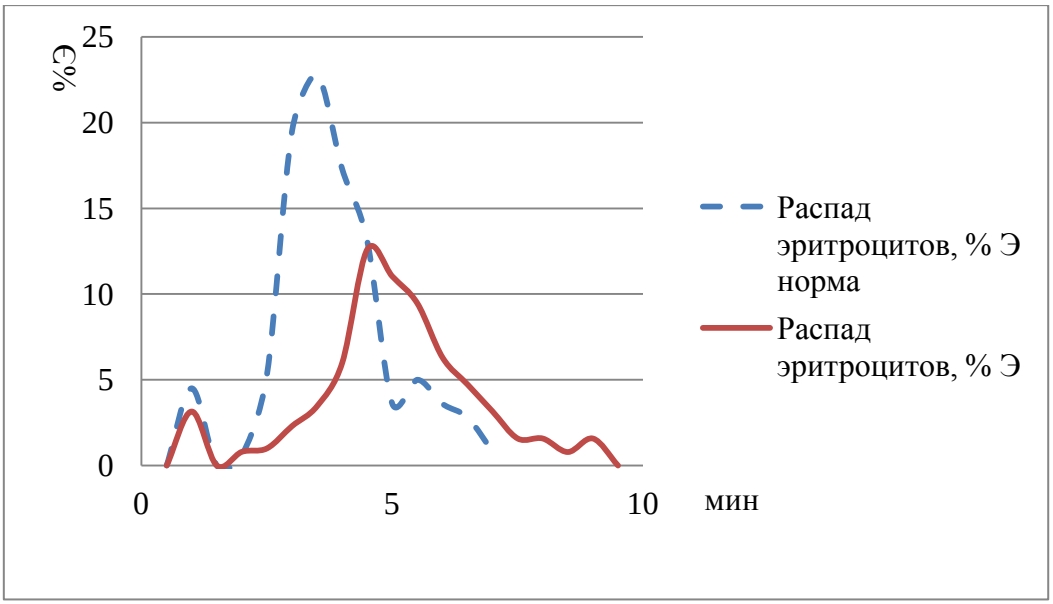


Рисунок 1.Кислотная резистентность крови при ишемической болезни сердца

Данная эритрограмма характеризуется понижением ко 2 минуте и повышением с пиком гемолиза на 5 минуте с последующим медленным снижением, приходя к нулевой линии на 9,5 минуте. На эритрограмме выявлялись три основных участка. Первый – 9,5–7 минут соответствует повышенностойким эритроцитам зрелостью 28–30 дней (58%). Второй – 7–4,5 минут – среднестойким эритроцитам зрелостью 30–90 дней (32%). Третий – 4,5–2 минут – пониженностойким эритроцитам зрелостью 90 дней (10%).

Изменения по началу и пику гемолиза статистически достоверны ($p<0,05$). Изменения по окончанию гемолиза не достоверны ($p>0,05$), что говорит о тенденции к увеличению.

Концентрация эстрадиола в норме у здоровой женщин до менопаузы 15 – 400 пг/мл, после менопаузы 5 – 30 пг/мл, во время беременности 203 – 17890 пг/мл, у мужчин 5 – 53 пг/мл.

Исходя из данных иммуноферментного анализа, у мужчин с ишемической болезнью сердца наблюдается увеличение концентрации эстрадиола в сыворотке крови ($p<0,05$). У данных пациентов была обнаружена положительная корреляционная зависимость между концентрацией эстрадиола и началом ($r=0,22$, $p<0,05$), пиком ($r=0,62$, $p<0,05$) и окончанием ($r=78$, $p<0,05$) гемолиза. Вероятно, что при данной патологии развивается стресс-реакция организма, вследствие чего повышается уровень эстрадиола.

У женщин с ИБС наблюдается увеличение концентрации эстрадиола после менопаузы ($p<0,05$). У данных пациентов была обнаружена положительная корреляционная зависимость между концентрацией эстрадиола и началом ($r=0,7$, $p<0,05$), пиком ($r=0,13$, $p <0,05$) и окончанием ($r=68$, $p<0,05$) гемолиза.

Из этого следует, что увеличение концентрации эстрадиола в сыворотке крови будет связано с увеличением показателей кислотной эритрограммы и наоборот.

Выводы:

1. Установлено увеличение кислотной резистентности эритроцитов крови у людей с ишемической болезнью сердца.

2. Установлено увеличение концентрации эстрадиола в сыворотке крови у людей с ИБС.

3. Выявлена корреляционная зависимость между показателями кислотной эритрограммы и концентрацией эстрадиола при ишемической болезни сердца.

Список литературы

1. Азизова, Т. В., Власенко, Е. В., Григорьева, Е. С., Мосеева, М. Б., Осовец, С. В., Гергенрейдер, С. Н. Показатели заболеваемости и смертности от Ишемической болезни сердца в Когорте рабочих по «МАЯК», подвергшихся хроническому облучению/ Азизова, Т. В., Власенко, Е. В., Григорьева, Е. С., Мосеева, М. Б., Осовец, С. В., Гергенрейдер, С. Н // Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2011. – Том 56, № 3.

2. Павлова, В. И., Мамылина, Н. В., Шахов, В. П. Динамика изменений со стороны эритропоэтических островков костного мозга при эмоционально-болевом стрессе/ Павлова, В. И., Мамылина, Н. В., Шахов, В. П // «Челябинский государственный педагогический университет» 2011. – Вестник Уральской Медицинской Академической Науки – № 4.

3. Карева, Е. Н., Олейникова, О. М., Панов, В. О., Шимановский, Н. Л., Скворцова В. И., Эстрогены и головной мозг / Карева, Е. Н., Олейникова, О. М., Панов, В. О., Шимановский, Н. Л., Скворцова В. И // ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» 2012. – 23блок Вестник РАМН 2.

4. Гительзон, И. И., Терсков, И. А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови/ Гительзон, И. И., Терсков, И. А // учеб. пособие. Красноярск: Издательство Сибирского отделения Академии наук СССР, 1959. – 11-30с.

УДК 616.381-002.3

АКТИВНОСТЬ NAD(P)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ ГНОЙНОМ ПЕРИТОНИТЕ

Азахов Д.Т., Беленюк В.Д., Гвоздев И.И.
научный руководитель д-р мед. наук Савченко А.А.
НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН

Распространенный гнойный перитонит (РГП) остается одной из нерешенных проблем современной хирургии. Уже не одно десятилетие летальность при этом осложнении удерживается на уровне 20-30% и более. Такая высокая летальность призывает к необходимости выработки единой тактики лечения. Постоянное увеличение числа больных связано с воспалительными процессами в брюшной полости в результате острого аппендицита, и как последствие, порой, хирургического вмешательства.

Течение перитонита, характер и особенности развития гнойных инфекционных осложнений определяются не только тяжестью основного патологического процесса и адекватностью проводимого лечения,но и зависят от происходящих изменений в системе иммунитетаПоказано, что перитонит протекает на фоне иммунодефицита, а в терминальной стадии (полиорганной недостаточности) иммунная недостаточность наиболее выражена. Предполагается, что нарушения в иммунной системе могут иметь решающее значение для возникновения различных осложнений заболевания. Учитывая, что все модуляторы функциональной активности лимфоцитов, основного структурно-функционального элемента иммунной системы, прежде всего изменяют метаболизм клетки, переключая субстратный поток с одного метаболического пути на другой, влияя на энергетику клетки и синтетические процессы, нарушения иммунореактивности не могут не иметь метаболической основы.

Целью исследования являлось изучение уровней активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназлимфоцитов крови при распространенном гнойном перитоните. Исходя из цели были сформулированы следующие задачи: 1) определить биолюминесцентную активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ контрольной группы и больных РГП, 2) оценить различия уровней биолюминесцентной активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ контрольной и опытной групп.

Материалы и методы. Обследовано 12 больных распространенным гнойным перитонитом в динамике лечениянри поступлении в стационар и на 7, 14 и 24 день после операции. Группу контроля составили67 здоровых людей. Из венозной крови обследуемых выделяли лимфоциты. Суспензию выделенных лимфоцитов, разрушали путем заморозки-разморозки осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМдитиотреитола. Далее в 150мкл инкубационной смеси, содержащей соотвествующийсубстрат и кофактор, вносили 50мкл суспензии разрушенных лимфоцитов.

Определение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах проводили биолюминесцентным методом. Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы(МДГ), НАДФ-зависимой малатдегидроеназы (НАДФМДГ), НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ), НАД-зависимой

глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ, соответственно).

Биолюминесцентное определение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ проводили по ранее разработанным методикам.

После инкубации при 37 °С в течение 30 мин (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)) или 5 мин (для реакции с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мклфлавинмононуклеотида ФМН) в концентрации $1,5*10^{-5}$ М, 50 мкл 0,0005% миристиного альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктаза- люцифераза (все реактивы биолюминисцентной системы разведены в 0,1 М K^+, Na^+-фосфатном буфере с pH 7,0). После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы определение активности фермнетов проводится с помощью биолюминометора «CL3606M» (СКТБ «Наука», Красноярск). Ферментативная система НАД(Ф)Н: ФМНоксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из Photobacteriumleiognathii оксидоредуктазы из Vibriofischerib Институте биофизики СО РАН г. Красноярск .Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoftInc., 2007). Описание выборки производили с помощью подсчёта медианы (Me) и интерквартального размаха в виде 25 и 75 процентилей (C25–C75). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критериюMann-Whitney.

Результаты и обсуждение.При исследовании уровней активности НАДФ-зависимых дегидрогеныз лимфоцитов у больных РГП обнаружено, что активность НАДФМДГ, НАДФГДГ, НАДИЦДГ и МДГ в лимфоцитах крови больныхРГП снижена относительно контрольных значений ($p<0,001$, $p=0,029$, $p<0,001$ и$p=0,009$ соответственно), так же, но не сильно, снижается активность и ЛДГ и Г3ФДГ ($p=0,155$) и ($p=0,833$).Наиболее выражено снижается активность ключевого фермента липидного анаболизма – НАДФМДГ. Также можно отметить, что малик-фермент принимает активное участие в реакциях катаболизма ксенобиотиков.Снижение активности НАДН-зависимой реакции ЛДГхарактеризует ингибирование субстратного потока на терминальной стадии анаэробного дыхания лимфоцитов крови у больных РГП. Следовательно, у больных РГП в лимфоцитах крови снижается активность ферментов, определяющих интенсивность анаэробной и аэробной энергетики и уровень пластических процессов, но при активации реакций липидного катаболизма и переноса продуктов через Г3ФДГ на окислительно-восстановительные реакции гликолиза. Интенсивность процессов липидного анаболизма и катаболизма ксенобиотиков в лимфоцитах крови больных РГП снижена.

УДК 612.766.1+612.825.8

ОПТИМИЗАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ ПЛОВЦОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИПЕРОКСИЧЕСКОЙ ГАЗОВОЙ СМЕСИ

Алиев Д.Ф.
научный руководитель д-р биол. наук, проф. Корягина Ю.В.
Сибирский государственный университет физической культуры и спорта

Аннотация: Целью данной работы явилось выявление влияния гипероксической газовой смеси на функциональное состояние кардиореспираторной системы и работоспособность пловцов. В исследовании приняли участие 11 пловцов женского пола, от 15 до 22 лет и квалификации не ниже 1 взрослого разряда. Результаты показали, что применение гипероксической газовой смеси способствует увеличению функциональных возможностей сердечно – сосудистой и дыхательной систем пловцов и результативности пловцов, способствует более быстрому и эффективному восстановлению.

Ключевые слова: плавание, гипероксия, работоспособность, функциональное состояние, сердечно-сосудистая система, дыхательная система.

Проблема исследования: Недостаток знаний об использовании гипероксических газовых смесей в спортивном плавании, что не позволяет определить целевое назначение и специфику практического применения кислородных смесей в системе подготовки пловцов высокого класса.

В настоящее время широкое распространение получает такое физиотерапевтическое средство как гипероксия. Гипероксия - как средство повышения функциональных возможностей, призвано оптимизировать адаптационные процессы, протекающие внутри организма, повысить результативность, а так же ускорить процессы восстановления спортсменов [2,5]

Имеется большое число научно-прикладных работ, которые показывают общий положительный эффект гипероксических газовых смесей [1,3-4]. Однако, использование их в спортивном плавании, не имеет достаточного научного обоснования: не понятны физиологические механизмы его воздействия, дозировка, сроки и способы применения.

На основании этого, изучение физиологического воздействия гипероксических газовых смесей на динамику функционального состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем пловцов и их работоспособность является актуальной проблемой, решение которой позволит определить практическую сторону использования гипероксии в системе подготовки высококвалифицированных пловцов.

Гипотезой послужило предположение о том что, целенаправленное использование гипероксической газовой смеси у пловцов повышает резервные возможности и экономичность функциональных систем (сердечно-сосудистой и дыхательной) организма, что в свою очередь увеличивает специальную работоспособность.

Цель работы: Выявить влияние применения гипероксической газовой смеси на функциональное состояние кардиореспиратрной системы и работоспособность пловцов.

Организация исследования. Исследование было проведено на базе научно-исследовательского института Деятельности в экстремальных условиях Сибирского государственного университета физической культуры и спорта и в плавательном

бассейне «Альбатрос» 50 м. В исследовании приняли участие 11 пловцов женского пола, от 15 до 22 лет и квалификации не ниже 1 взрослого разряда. В **таблице 1** представлен дизайн нашего исследования.

Таблица 1. Дизайн исследования

№ действия п/п	1 тест	2 тест	3 тест
1	Регистрация ЧСС, О2, ВСР, спирография	Регистрация ЧСС, О2, ВСР, спирография	Регистрация ЧСС, О2, ВСР, спирография
2	Разминка	Разминка	Разминка
3	-	**5 мин. Дыхание О2**	-
4	Основная работа (8*200м. в/с в маленьких лопатках, в режиме 3мин. 30с.) Во время работы монитор ЧСС	Основная работа (8*200м. в/с в маленьких лопатках, в режиме 3мин. 30с.) Во время работы монитор ЧСС	Основная работа (8*200м. в/с в маленьких лопатках, в режиме 3мин. 30с.) Во время работы монитор ЧСС
5	-	-	**5 мин. Дыхание О2**
6	Восстановление 20 мин ЧСС, О». ВСР, спирография 2, 5, 10, 20	Восстановление 20 мин ЧСС, О». ВСР, спирография 2, 5, 10, 20	Одновременно с дыханием восстановление 15 мин ЧСС, О». ВСР, спирография 2, 5, 10, 20

Методы исследования: Исследование сердечно-сосудистой системы проводилось с помощью метода анализа вариабельности ритма сердца (ВРС). Для оценки состояния дыхательной системы использовали спирограф «Спиро-Спектр». Частота сердечных сокращений регистрировалась при помощи монитора сердечного ритма «Polar». Насыщение артериальной крови кислородом (SaO2, %) определялось при помощи пульсоксиметра. Гипероксическая смесь создавалась при помощи портативного концентратора кислорода. Обработка результатов осуществлялась с помощью программы Statistica.

Результаты исследования

Состояние сердечно-сосудистой и дыхательной систем пловцов до и после специальной нагрузки

У спортсменов перед максимальной специальной нагрузкой функциональное состояние характеризовалось умеренным повышением ЧСС, преобладанием активности симпатической нервной системы. После выполнения теста, ЧСС ко 2-й минуте восстановления резко снижается со 190 до 110 ударов в минуту. Показатели ВСР изменяются на этапах срочного восстановления по сравнению с показателями, которые были взяты до нагрузки. Индекс напряжения после нагрузки увеличился в более чем в 7 раз. Показатель RMSSD снизился ко 2-минуте срочного восстановления почти в 2,5 раза, то же произошло и с pNN50 – снизился в 3 раза. Значительно был увеличен ИВР – в 5 раз; психофизиологическая цена в 10 раз. В последующем, показатели ВСР, на протяжении срочного восстановления, постепенно приходили в норму, к 20-й минуте восстановления некоторые показатели почти достигли фоновых величин. Самая большая частота сердечных сокращений, после 8 отрезка равнялась 205 уд/мин, что почти в 3 раза больше ЧСС состояния покоя.

Показатели дыхательной системы, сразу после специальной максимальной нагрузки, характеризуются незначительным снижением ЖЕЛ, РОвд, РОвыд на 2-й минуте срочного восстановления, в связи с работой организма на пределе возможностей. ДО, наоборот, увеличился на 2 минуте срочного восстановления, этому способствовала максимальная нагрузка, которая вызвала усиление частоты и глубины дыхания у спортсменов.

Влияние гипероксической ингаляции перед специальной нагрузкой на результативность и функциональные возможности организма пловцов

Анализ результатов, показанных спортсменами после выполнения специальной нагрузки, выявил улучшение результата во 2-м тесте, при использовании кислородной поддержки, по сравнению с 1-м тестом, когда кислород не использовался. Результаты проплывания отрезков показанные во 2-м тесте были улучшены по сравнению с 1-м тестом, причем на каждой отдельной двухсотметровке. Разница во времени проплывания между тестами в среднем равна 4 секундам. Функциональное состояние сердечно – сосудистой системы во 2-м тесте характеризуется более низким ИН на 2-й минуте восстановления, по сравнению с 1-м тестом. Так же, во 2-м тесте, наблюдается более быстрое восстановление ЧСС на всех этапах срочного восстановления, по сравнению с 1-м тестом. Однако, большинство показателей ВСР во 2-м тесте указывают на то что, в связи с увеличением результата, были увеличены функциональные резервы сердечно - сосудистой системы: снижение RMSSD, увеличение кардиоинтервалов, начиная с 5-й минуты срочного восстановления, а также спектральный анализ выявил более выраженное преобладание автономного контура регуляции ВНС. Однако уже к 20-й минуте, наблюдается переход на более экономный режим функционирования и смена регуляции в сторону парасимпатического отдела ВНС. Показатели внешнего дыхания во 2-м тесте по сравнению с 1-м характеризуются увеличением РОвыд, этот показатель возрос особенно на 2-й и 10 –й минутах срочного восстановления. На наш взгляд данные изменения связаны с тем, что после специальной максимальной нагрузки во 2-м тесте были увеличены частота и глубина дыхания, вследствие чего и увеличилась остаточная емкость легких, т.е РОвыд.

Влияние применения гипероксической ингаляции на процессы срочного восстановления организма пловцов

По нашему мнению, гипероксия, оказывает положительное влияние на протекание восстановительных процессов. В данном случае ЧСС снизилось в 3-м тесте (с применением кислородной поддержки) по сравнению с 1-м и 2-м тестами.

Особенно хорошо заметно восстановление системы кровообращения на 5-й и 20-й минутах срочного восстановления.

При анализе ВСР было выявлено достоверное изменение двух показателей временного (RMSSD) и спектрального (VLF) на 5-ой минуте восстановления между 1 и 3 тестами. Снижение вегетативного показателя ритма, индекса напряжения. Анализ показателей внешнего дыхания на 2 минуте срочного восстановления между 1-м и 2-м тестами, выявил динамику к увеличению ЖЕЛ и РОвыд во 2-м тесте.

На 5-й минуте срочного восстановления происходит увеличение резервного объема выдоха в тесте с кислородной поддержкой. На 10-й минуте срочного восстановления мы наблюдаем динамику к увеличению ЖЕЛ и РОвыд. Данные изменения свидетельствует о повышении резервных возможностей дыхательной системы.

Таким образом, проведенное исследование показало эффективность применения гипероксической газовой смеси для повышения результативности и функционального состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем пловцов

Выводы:

1. Функциональное состояние сердечно – сосудистой системы пловцов до нагрузки характеризуется оптимальной ЧСС, умеренным преобладанием симпатического отдела ВНС. Со стороны дыхательной системы наблюдается умеренное усиление частоты и глубины дыхания, что характерно для предстартового состояния. После максимальной специальной нагрузки происходит значительное увеличение ЧСС, отмечается выраженное преобладание симпатического отдела ВНС, снижение ЖЕЛ, РОвд, РОвыд, ДО.

2. Применение гипероксической газовой смеси способствует увеличению результатов на всех отрезках специальной максимальной нагрузки, а также увеличению функциональных возможностей сердечно – сосудистой и дыхательной систем пловцов.

3. Восстановление сердечно-сосудистой системы, при ингаляции гипероксической газовой смеси, после максимальной специальной нагрузки, характеризуется более быстрым снижением ЧСС, снижением активности симпатического отдела ВНС. Гипероксия способствует более быстрому и эффективному восстановлению и увеличению функциональных резервов дыхательной системы организма пловцов.

Список литературы

1. Аикин В.А. Совершенствование подготовки резерва спортивных сборных команд российской федерации в шорт-треке, биатлоне, легкой атлетике (виды на выносливость) / В.А. Аикин, В.И. Михалев, Ю.В. Корягина, Е.А. Реуцкая. - Омск, 2014. – 72 с.

2. Габрысь У. Шматлян-Габрысь Т. Применение кислорода как эргогенического средства в анаэробных гликолитических нагрузках у спортсменок и спортсменов// У. Габрысь, Т. Шматлян-Габрысь//Теория и практика физической культуры. – 1999. - № 6.

3. Михалев В.И. Использование кислородной поддержки для повышения предельных возможностей и экономичности функционирования организма спортсменов / В.И. Михалев, Е.А. Реуцкая, Ю.В. Корягина // Лечебная физкультура и спортивная медицина. 2012. - № 10. - С. 16-23.

4. Найдич С.И. Изучение эффективности газовых смесей для восстановления функций внешнего дыхания/С.И. Найдич//Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22(61). – С. 59-63.

5. Солодков А.С. Физиологические механизмы воздействия кислородно-гелиевых смесей на организм человека и обоснование их применения в адаптивной физической культуре/ А.С. Солодков, И.В. Левшин, А.Н. Поликарпочкин//Адаптивная физическая культура. – 2010. - № 2 (42). – С. 10-13.

УДК: 616-006.81.04

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ С ОГРАНИЧЕННОЙ КАЛОРИЙНОСТЬЮ НА СИСТЕМУ ГЛУТАТИОНА В ГЕПАТОЦИТАХ МЫШЕЙ С МЕЛАНОМОЙ

Алымова Е.В., Валеева К.В.
научный руководитель канд. биол. наук Титова Н.М.
Сибирский федеральный университет

Активные формы кислорода (АФК) в последние годы привлекают значительное внимание исследователей. Считается, что АФК составляют отдельную систему в организме, участвующую как в ряде физиологических функций, так и во многих патологических процессах.

Меланома – это злокачественная опухоль, развивающаяся из меланоцитов – пигментных клеток, продуцирующих меланины. Чаще всего меланому обнаруживают на коже, реже на глазах, слизистых оболочках половых органов, ротовой полости или других местах [1]. При данной патологии могут наблюдаться структурные или метаболические нарушения, которые играют важную роль при изменении баланса между прооксидантной и антиоксидантной системами, в сторону развития окислительного стресса (ОС). При ОС образуется избыток активных форм кислорода, которые инициируют окислительное повреждение клеточных компонентов: ДНК, белков, липидов и углеводов. Защиту организма от АФК и продуктов перекисного повреждения биомолекул осуществляет антиоксидантная система, важнейшим компонентом, которой служит восстановленный глутатион (GSH), а так же глутатионзависимые ферменты – глутатионпероксидаза (GPO) и глутатион-S-трансфераза (GST).

Цель работы – оценить содержание GSH и активность глутатионзависимых ферментов в гепатоцитах мышей с меланомой на фоне диет с различной калорийностью.

Материалы и методы.

В эксперименте участвовало 47 мышей линии $C_{57}B_{16}$. Дизайн эксперимента приведен в таблице 1.

Группа	Описание
1 группа	Мыши без опухоли на базовой диете (без ограничения калорийности - получали корм согласно физиол. потребностям) в течение 21 дня.
2 группа	Мыши без опухоли, диета с ограничением калорийности на 30% в течение 21 дня
3 группа	Мыши с опухолью содержались на диете с ограничением калорийности на 30% в течение 21 дня
4 группа	Мыши с опухолью с диетой базовой (без ограничения калорийности, мыши получали корм "Чара" - полностью удовлетворялись физиологические потребности в энергии, и всем макро-, микронутриентам и минорным компонентам пищи).

Объектом исследования служили гомогенаты печени мышей всех четырех групп (табл.1). В гомогенатах определяли содержание малонового диальдегида (MDA) – маркера перекисного окисления липидов (ПОЛ), количество восстановленного глутатиона (GSH) и активность антиоксидантных ферментов – GPO и GST. Содержание MDA оценивали по его реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, в

результате которой образуется окрашенный комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм (Ko, Godin, 1990). Определение количества восстановленного глутатиона основано на его взаимодействии с 5,5′-дитио(бис)-нитробензойной кислотой (ДТНБК) с образованием окрашенного в желтый цвет аниона 2-нитро-5-тиобензоата, концентрацию которого регистрировали спектрофотометрически при длине волны 412 нм (Beutler, 1990). Активность глутатионпероксидазы оценивали по изменению содержания GSH в пробах до и после инкубации с модельным субстратом в ходе цветной реакции с ДТНБК (Медицинские лабораторные технологии, 1999). Активность глутатион-S-трансферазы определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом, увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрировали на «Specol 1300 Analytik Jena» при длине волны 340 нм (максимум поглощения глутатион-S- ХДНБ) (Habig et al, 1974) [2].

Для обработки полученных результатов использовались программы Statistica 8 и Microsoft Office Excel 2007 в Windows XP. Обработку данных проводили с помощью подсчета медианы, интервального разброса (С25-С75 процентили). Проверку гипотезы о статистической достоверности величин исследуемых показателей несвязанных выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение.

Было проведено сравнительное исследование содержания MDA, GSH и активности антиоксидантных ферментов – GPO и GST в гомогенатах печени мышей с меланомой при различных видах диеты (базовая диета и диета с ограниченной на 30% калорийностью). Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание MDA, GSH и активность антиоксидантных ферментов в печени мышей с меланомой на фоне диеты с низкой и высокой калорийностью

Исследуемый показатель	1 группа (n=8)	2 группа (n=19)	3 группа (n=10)	4 группа (n=10)
	Me, C_{25}-C_{75}	Me, C_{25}-C_{75}	Me, C_{25}-C_{75}	Me, C_{25}-C_{75}
MDA мкмоль/г белка	2,55 1,40-5,00	2,10 1,40-2,70	5,91 3,90-7,41 p_2<0,01	4,20 3,68-4,57
GPO мкмоль/г белка	3,08 2,11-3,72	2,14 1,79-2,90	3,52 3,34-4,29 p_2<0,01	5,62 5,04-7,74 p_1<0,05 p_3<0,05
GST ммоль/мин/г белка	2,16 1,82-2,425	1,99 0,61-2,99	5,77 5,00-6,85 p_2<0,05	7,16 6,93-9,80 p_1<0,01 p_3<0,05
GSH мкмоль/г белка	0,30 0,16-0,65	0,40 0,30-0,62	0,55 0,52-0,59	0,88 0,46-1,17 p_1<0,01

Примечание: p_1 – достоверность по сравнению с 1 группой, p_2 – достоверность по сравнению со 2 группой, p_3 – достоверность различий показателей у мышей с меланомой (диета с различной калорийностью).

Уровень малонового диальдегида достоверно повышается на 182% в гомогенатах печени с меланомой при содержании мышей на диете с ограниченной калорийности, в случае диеты без ограничения калорийности наблюдается тенденция к увеличению содержания MDA – на 65% по сравнению с аналогичными показателями в

контрольных группах. Повышение MDA может быть косвенным подтверждением увеличения уровня активных форм кислорода, запускающих не только процессы ПОЛ, но и оксидативной модификации других биомолекул. MDA является высокореакционным соединением, способным модифицировать аминогруппы как в мембранных, так и в цитоплазматических белках, образуя с ними шиффовы основания и приводя к потере их биологической активности.

Содержание GSH в гепатоцитах мышей с меланомой достоверно превышает контрольную величину на 190% при содержании мышей на базовой диете, и незначительно и недостоверно – на 36 % при диете с ограниченной калорийностью.

Активность глутатионпероксидазы, фермента, устраняющего пероксид водорода и липопероксиды, достоверно повышается в гомогенатах печени мышей с меланомой, содержащихся как на базовой, так и на ограниченной по калорийности диете, на 82% и 64% соответственно, при сравнении с контрольными показателями. Такая же, но более выраженная направленность наблюдается для GST – фермента, участвующего в детоксикации экзогенных и эндогенных ксенобиотиков, в том числе и продуктов ПОЛ. Достоверное повышение активности фермента при обоих видах диет по сравнению с контрольными величинами составило – 231% и 190% соответственно. Повышение активности глутатионзависимых ферментов может быть связано как с увеличением их количества в результате ускорения процесса транскрипции соответствующих генов, так и изменением окислительно-восстановительного статуса гепатоцитов, оказывающего влияние на активность GPO и GST.

Сравнительный анализ исследуемых показателей в двух группах мышей с меланомой на фоне диет с различной калорийностью свидетельствует о достоверном снижении активности GPO и GST в гепатоцитах мышей, содержащихся на диете с ограниченной калорийностью, и увеличении внутриклеточного уровня MDA. Более низкий уровень GSH, возможно связан со снижением биосинтетической способности гепатоцитов из-за недостатка аминокислот, требующихся для синтеза глутатиона (глутамат, цистеин, глицин), энергоресурсов, нельзя исключить и участия GSH в неферментативное устранение АФК.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующее заключение:

• меланома является свободно-радикальной патологией, для которой характерно развитие окислительного стресса;

• антиоксидантная активность глутатионовой системы в гепатоцитах мышей с меланомой, содержащихся на ограниченной по калорийности диете, снижена;

• в гепатоцитах мышей с меланомой, содержащихся на диете с ограниченной калорийностью, интенсифицируются процессы перекисного окисления липидов.

Список используемой литературы

1. Ганцев Ш.Х. Онкология /Ш.Х. Ганцев. – М.: Медицинское информационное агентство, 2006.

2. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практическим занятиям / Н.М. Титова, Т.Н. Замай, Т.Н. Субботина, А.А.Савченко. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.

3. Электронный ресурс [http://earthpapers.net].

УДК 57.085.23

СОЗДАНИЕ МАКРО- И МИКРОПОРИСТЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПЗГБ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ И ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Анисимова А. Е., Шумилова А.А.
научный руководитель д. б. н. Волова Т.Г.
Сибирский федеральный университет

Реконструкция дефектов и улучшение процесса их заживления у костной ткани при помощи новых технологий, в настоящее время, является актуальной проблемой в медицине. Это обусловлено высоким уровнем травм опорно-двигательной системы и других немаловажных заболеваний костной ткани. Предпочтение в костно-пластической хирургии отдается пористым материалам, поскольку они обладают быстрой инфильтрацией, что необходимо в среде живого организма. Пористая структура матрикса обладает большей эффективностью остеоинтегративных процессов за счет усиления сорбционной способности и увеличения общей площади частиц. Образующаяся костная ткань прорастает в поры материала, тем самым обеспечивая прочную связь с костью.

Особый интерес, применительно к этим задачам вызывают биоматериалы (полимеры) микробиологического происхождения – полимеры β- и γ-гидроксимасляной кислот и сополимеры β-гидроксимасляной с другими монокарбоновыми кислотами (валериановой, гексановой), которые относятся к классу перспективных природных биоматериалов, так называемых полигидроксиалканоатов (ПГА) (Волова и др., 2010). В отличие от полилактидов, полигидроксиалканоаты термопластичны, имеет более высокие прочностные характеристики, не растворяется в водных средах, поэтому сроки их биодеструкции более длительны; продукт распада этого полимера – β-гидроксимасляная кислота, не вызывает такого резкого закисления тканей, как молочная кислота

Цель работы- конструирование и исследование макро- и микропористых матриксов на основе поли-3-гидроксибутирата

Материалы и методы

В качестве материала исследования использовали гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, поли-3-гидроксибутират (П3ГБ). П3ГБ по своим базовым показателям близок к синтетическим термопластикам (полипропилену и полиэтилену), но так же обладает свойствами биосовместимости и биоразлагаемости.

В связи с хорошей растворимостью ряда полимеров в неполярных растворителях есть возможность использования полимерных растворов для изготовления пористых матриксов. Для получения макропористых матриксов использовали метод выщелачивания порообразующего вещества-сахарозы из полимерного раствора в хлороформе.

Следующий метод получения матрикса с пористой структурой заключается в сублимационной сушке. Полимер растворяли в органическом растворителе (диоксан) и замораживали предварительно при разных температурах (-20С, -80С, давление 1,030 mbar и 0,03 mba, соответственно). После предварительной заморозки, полимерный раствор подвергали лиофилизации в лиофильной сушке ALPHA 1-4/2-4 LDC-1M. Микроструктуру композитных изделий анализировали сканирующей электронной микроскопией с использованием микроскопа TM-3000 (Hitachi HT Corporation, Япония) при напряжении 5 кВ. Для определения влагопоглощения полученных образцов, предварительно взвесили высушенные образцы, после поместили в жидкость и взвесили их после. Влагопоглощение образцов определяли по формуле: EWC = (Ws –

Wd) /Ws •100,где: Wd - вес высушенного образца, Ws -вес образца после экспозиции в жидкости.

Результаты

Подобраны оптимальные параметры процесса выщелачивания, для конструирования макропористых матриксов на основе ПЗГБ размером 1×0,7 см., массой 60 мг. Установлено, что для получения наиболее прочных пористых 3D форм подходит полимерный раствор концентрацией 3% и время выдержки 48 часов. По данным анализа микроструктуры носителей, выполненный с применением морфологического анализа (программа обработки данных Scanmaster), отмечено формирование внутри матрикса системы взаимосвязанных макропор размером 110-120 мкм, которые составляют в носителе до 90 %, остальные 10 % приходятся на мелкие поры (10 -60 мкм). Суммарная площадь всех выделенных пор составляет около 87,3 %.

Микропористые матриксы на основе ПЗГБ диаметром 3,4 см, и высотой 1см с массой 1,06 грамма (5% раствор), и 540мг(3% раствор)., полученные с помощью лиофилизации сильно отличались от макропористых 3D форм. как визуально так и по своим физическим характеристикам. Размер пор лифилизированных матриксов находился в диапазоне 40 - 60 мкм, суммарная пористость 82 %. Отмечено, что в зависимости от температуры предварительной заморозки наблюдается незначительное изменение размера пор и их расположение.

УДК 616.517: 612.017.1

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ПСОРИАЗЕ И ПСОРИАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ

Барило А.А.
научный руководитель д-р мед. наук, проф. Смирнова С.В.,
канд. биол. наук Смольникова М.В.
ФГБНУ ««Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»

Введение. Псориаз (ПС) – системное, мультифакториальное заболевание, развивающееся под влиянием эндогенных и экзогенных факторов и характеризующееся поражением различных органов и систем с преимущественным вовлечением в патологический процесс кожи. Распространенность ПС, по данным различных авторов, составляет 57,6–60,4 человека на 100 000 населения. ПС относится к наиболее тяжело протекающим дерматозам и представляет не только медицинскую, но и социальную проблему [1]. Системный воспалительный процесс, ассоциированный с ПС, оказывает влияние на иммунологические изменения, которые приводят к прогрессированию патологии, в частности развитию псориатического артрита (ПсА). ПсА является одной из наиболее тяжелых и инвалидизирующих форм ПС и представляет собой системное заболевание, ассоциированное с ПС, приводящее к развитию эрозивного артрита, костной резорбции, множественных энтезитов и спондилоартрита. В литературе, посвященной ПсА, значительное место отводится не только функциональным нарушениям пораженных суставов, но и увеличению смертности больных ПсА, в сравнении с популяционными показателями (у мужчин на 59%, у женщин на 65%). Все эти факторы в конечном итоге способствуют социальным и экономическим потерям, обуславливающим актуальность изучения псориатической болезни [2].Современные исследования в области иммунологии и молекулярной биологии ПС и ПсА подтверждают наличие иммунологических нарушений, связанных, прежде всего, с Th17/Th1-зависимыми аутоиммунными процессами [3]. В настоящее время в патогенезе ПС и ПсА ведущая роль отводится дисбалансу провоспалительных и антивоспалительных цитокинов, которые являются регуляторами сложной сети взаимодействий иммунокомпетентных клеток, кератиноцитов, клеток синовиальной оболочки [4]. Несмотря на достигнутые успехи в изучении патогенеза ПС и ПсА сведения о содержании цитокинов в периферической крови больных ПС и ПсА противоречивы. В доступной литературе отсутствуют сведения, касающиеся иммунологических маркеров прогрессирования ПС. Изучение иммунных механизмов развития ПС и ПсА с точки зрения эндогенной регуляции межклеточных взаимодействий позволит установить новые дифференциально-диагностические критерии оценки тяжести, прогнозирования течения заболевания и ориентировать в направлении патогенетически обоснованной коррекции выявленных нарушений.

Цель. Определить уровень цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-a) в периферической крови и выявить приоритетный характер иммунного реагирования при ПС и ПсА.

Материалы и методы. Обследовано 97 больных ПС в возрасте от 18 до 66 лет, которые с учетом клинических проявлений были разделены на 2 группы: 1 группа – больные ПС (n=49), 2 группа – больные ПсА (n=48). 3 группу составили практически здоровые доноры крови (n=45), сопоставимые по полу и возрасту. Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным письменным согласием пациента. Протокол обследования больных и здоровых людей (контрольная группа)

соответствовал этическим стандартам и был разрешен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИИ МПС» СО РАМН. Критерии включения в исследование: наличие клинически подтвержденного ПС в прогрессирующей стадии, наличие клинически подтвержденного ПсА, возраст от 18 до 70 лет. Критериями исключения из исследования являлись: наличие сопутствующих соматических хронических заболеваний в стадии декомпенсации, обострение сопутствующих хронических заболеваний внутренних органов, указание в анамнезе на проведенную ранее цитостатическую терапию либо системную терапию глюкокортикостероидами, наличие доброкачественных и злокачественных опухолей, сахарного диабета, системных и психических заболеваний, беременность и лактация, алкоголизм и/или наркомания. Диагноз ПС подтверждался следующими диагностическими критериями: наличие типичных высыпаний, состоящих из папулезных или бляшечных элементов, четко отграниченных от здоровой кожи, розовато-красного или насыщенно-красного цвета, покрытых рыхлыми чешуйками серебристо-белого цвета; наличие при поскабливании элементов последовательной псориатической триады феноменов («стеаринового пятна», «терминальной пленки», «точечного кровотечения»). Диагноз ПсА устанавливался на основании диагностических критериев CASPAR (Classification criteria for Psoriatic Athritis). Степень тяжести псориатического процесса, выражаемая международным индексом PASI (Psoriasis Area and Severity Index — индекс оценки степени тяжести ПС) оценивалась с использованием стандартизированной бальной системы оценки основных клинических симптомов: эритемы, шелушения, инфильтрации. Все больные обследованы в прогрессирующую стадию кожного процесса до начала проведения симптоматической и патогенетической терапии. Концентрация цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-α) в сыворотке крови определялась путем твердофазного иммуноферментного анализа. Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась на персональном компьютере Intel Pentium IV с использованием прикладных программ «Statistica 6.0». Полученные результаты представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах в виде 25% и 75% процентилей: Me (25%; 75%). Для всех видов статистического анализа различия считались статистически достоверными при достигнутом уровне значимости $p<0,05$ [5].

Результаты. В результате проведенных нами исследований установлено, что ПсА чаще диагностирован у женщин: 34 (70,8%) и 14 (29,2%), а ПС – у мужчин: 42 (85,8%) и 7 (14,2%), соответственно, $p_{1,2}<0,00001$. Средний возраст больных ПС значительно меньше в сравнении с группой больных ПсА: 32,0±1,64 и 47,5±1,69, соответственно, $p_{1,2}=0,04$. Значимых различий по возрасту внутри обеих групп не отмечается. Выявлено, что у больных ПсА индекс PASI достоверно выше, в сравнении с группой больных ПС: 17,8±0,9 против14,3±0,9, $p_{1,2}=0,03$. В результате проведенных исследований в обеих группах больных ПС независимо от степени тяжести заболевания выявлено достоверное увеличение уровня цитокина Th2-профиля (IL-4) и снижение цитокина Th1-профиля (IFN-γ) в сыворотке крови в сравнении с контрольной группой (таблица 1). Концентрация IL-4 в сыворотке при ПС составила 3,3 пг/мл (2,1; 16,2), при ПсА – 5,25 пг/мл (2,55; 10,4), в контрольной группе 2,9 пг/мл (0,6; 6,2), $p_{1,2}=0,5$, $p_{1,3}= 0,006$, $p_{2,3}= 0,001$. У больных ПсА в сравнении с группой больных ПС в сыворотке крови выявлены статистически значимые различия в концентрации цитокинов TNF-α и IFN-γ. Уровни TNF-α и IFN-γ у больных ПсА достоверно выше в сравнении с группой больных ПС (таблица 1).

Таблица 1. Концентрация цитокинов в сыворотке крови при псориазе и псориатическом артрите

Показатели Me[C25;C75]	ПС (1) (n=49)	ПсА (2) (n=48)	Контроль (3) (n=45)	p
IL-4 (пг/мл)	3,3 [2,1; 16,2]	5,25 [2,55; 10,4]	2,9 [0,6; 6,2]	$p_{1,2}$=0,5 $p_{1,3}$=0,006 $p_{2,3}$=0,001
TNF-α (пг/мл)	8,1 [3,4; 18,6]	13,6 [6,7; 32,0]	8,1 [3,6; 25,0]	$p_{1,2}$=0,005 $p_{1,3}$=0,75 $p_{2,3}$=0,06
IFN-γ (пг/мл)	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 20,2]	26,5 [0,0; 32,5]	$p_{1,2}$=0,0005 $p_{1,3}$=0,000001 $p_{2,3}$=0,0002

Примечание: достоверность различий (p) критерий Манна-Уитни

Достоверных различий в уровне IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α в сыворотке крови между группами больных и группой здоровых людей не выявлено. При сравнении больных ПС и больных ПсА между ними не выявлено достоверных различий в уровне цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 в сыворотке крови.

Выводы. На основании проведенных нами исследований выявлены особенности цитокинового профиля при ПС: девиация в сторону Th2-профиля (увеличение уровня IL-4 и снижение уровня IFN-γ). Данные показатели косвенно свидетельствует об угнетении функциональной активности Т-хелперов 1 типа и истощении функциональных резервов всех иммунокомпетентных клеток. Повышение продукции IL-4 при ПС и ПсА отражает попытку переключения иммунного ответа на Th2-тип, который характерен для формирования аутоиммунного процесса. Маркером формирования ПсА может служить: женский пол, возраст старше 50 лет, высокий индекс PASI, повышение концентрации TNF-α и IFN-γ в сыворотке крови больных ПС. Иммуно-воспалительная активность патологического процесса при ПсА подтверждается наличием более высокого уровня ключевых провоспалительных цитокинов TNF-α и IFN-γ, которые способствуют переключению иммунного ответа на Th1-тип. Следовательно, наличие суставного синдрома у больных ПС приводит к развитию активного воспалительного процесса и прогрессированию патологии с формированием ПсА.

Список литературы

1. Palijan, T.Z. The impact of psoriasis on the quality of life and psychological characteristics of persons suffering from psoriasis / T.Z. Palijan., D. Kovacević, E. Koić // CollAntropol. – 2011. – Vol. 2 – P. 81-85.

2. Смирнова, С.В Клинико-иммунологические особенности псориаза / С.В. Смирнова, М.В. Смольникова, В.Ю. Райкова // Цитокины и воспаление. –2010. –Т. 9, № 4. – С. 121-122.

3. Kim, J. The immunopathogenesis of psoriasis / J. Kim, J.G. Krueger // Dermatol. Clin. –2015. – Vol. 33, № 1. – P:13-23.

4. Смольникова, М.В. Генетические факторы в иммунопатогенезе псориаза и псориатического артрита / М.В. Смольникова, С.В. Смирнова // Медицинская иммунология. – 2014. –Т. 16, № 3. – С. 211-220.

5. Гланц, С. Медико-биологическая статистика – М.: Практика, 1999. – 459 с.

УДК 616-085

ПРИМЕНЕНИЕ ЭРИТРОЗИНА В АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Белова Е.С.,
научный руководитель д-р хим. наук Гришковец В.И.
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Крымский федеральный университет, Таврическая академия им. В.И. Вернадского

Метод фотодинамической терапии является перспективным методом для лечения бактериальных инфекций полостных органов. Инициаторами фотодинамический процессов служат преимущественно триплетные молекулы фотосенсибилизаторов, синглетный кислород, свободные радикалы и перекиси органический соединений. Анализ спектров поглощения и люминесценции молекулярного кислорода показывает, что существует несколько типов синглетного кислорода – O_2 в синглетном $^1\Sigma_g^+$-состоянии, O_2 в синглетном $^1\Delta_g$-состоянии и димеры $(O_2)_2$–$(^1\Delta_g)_2$, $(^1\Delta_g\,^1\Sigma_g^+)$ и $(^1\Sigma_g^+)_2$. Высокая химическая активность присуща только мономерному молекулярному кислороду в $^1\Delta_g$-состоянии. Реакционная способность молекул O_2в этом состоянии гораздо выше, чем у невозбужденных молекул кислорода. Синглетный кислород вступает в химические реакции с образованием циклических перекисей, которые нестабильны и быстро распадаются. Субстратами окислительных реакций являются разнообразные биологически важные соединения – аминокислоты и белки, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты, липиды и др. Таким образом, образование синглетного кислорода в биологической системе может приводить к различным деструктивным эффектам[1].

Кислород в синглетном состоянии $^1\Sigma_g^+$ обладает энергией возбуждения 37,7 ккал/моль. Он может быть произведен сенсибилизаторами, имеющими энергию триплетного возбужденного уровня 37,7 ккал/ моль, тогда как $O_2(^1\Delta_g)$ может быть образован переносом энергии от всех сенсибилизаторов с энергией >22,6 ккал/моль. По данным Н.В. Шинкаренко эритрозин имеет энергию низшего триплетного состояния 43,1–45,8 ккал/моль [2]. Таким образом, он может быть использован как эффективный сенсибилизатор для генерации активного синглетного кислорода.

Эритрозин (тетраиодфлуоресцеин) является флуоресцирующим красителем, он окрашивает ткани в красный цвет и флуоресцирует разными цветами: от желтого до оранжево-красного (в зависимости от марки и концентрации). Максимум поглощения эритрозина составляет 525 нм.Так как триплетный уровень эритрозина расположен выше синглетного уровня кислорода, то для него реализуется механизм фотосенсибилизации, представленный на рисунке 1.

$$^3P + O_2 \rightarrow P + {}_1O_2$$

Рис. 1. Механизм фотосенсибилизации кислорода эритрозином [1].

Опыты с флуоресцентными красителями показали, что после полоскания их растворами интенсивно окрашивается только спинка языка, слизь во рту и зеве. Однако эта окраска быстро исчезает после последующего полоскания рта водой или проглатывания ее. Но полоскание рта водой не ослабляли флуоресцентную окраску спинки языка, и ее можно наблюдать даже спустя 12 часов[3]. Таким образом, можно заключить, что нормальная слизистая оболочка водными растворами эритрозина не окрашивается, за исключением спинки языка и слизи.

Опыты с полосканием поврежденной слизистой оболочки имеют другие результаты. Фибринозные налеты на местах вскрытия перитонзиллярного абсцесса, в нишах удаленных миндалин, все незначительные дефекты слизистой оболочки интенсивно адсорбируют флуоресцирующий краситель эритрозин. Последующее полоскание водой рта и глотки не вызывают ослабление флуоресцентной окраски, ее можно наблюдать на фибринозных налетах в течение 12 часов [3].

Ввиду того, что происходит окрашивание только поврежденных частей слизистой оболочки: ссадин, ран, язв, флуоресцирующий краситель эритрозин может быть использован для выявления дефектов слизистой оболочки (например, небольших, часто незаметных поверхностных туберкулезных язв), которые скрыты от невооруженного глаза. Сопоставив данную информацию с тем, что эритрозин является эффективным фотосенсибилизатором, можно предложить его широкое применение для фотодинамической терапии слизистых оболочек.

Успешное применение ФДТ для инактивациимикроорганизмов в основном зависит от фотосенсибилизатора иисточника света. Практикующие стоматологи в настоящее время используют эритрозин для окрашивания и визуализации зубного налета. Источники некогерентного синего света, такие как галогенная лампа и светодиод обычно используются в стоматологии для фотополимеризации зуба. Однако применяя тот же фотосенсибилизатор и те же источники света можнооказывать фототоксическое влияние на грамположительные бактерии, такие как Streptococcusmutans, которые играют главную роль в разрушении зубов.

На рисунке 2 представлены данные об эффективности уничтожения бактерий для разных концентраций эритрозина и разных источников света. Как видно из данного графика, имеется прямая зависимость между концентрацией эритрозина и эффективности фотовоздействия на бактерии. Что касается источников света, то при больших концентрациях эритрозина выбор источника возбуждения не имеет значения, однако на малых концентрациях большей эффективности можно добиться использованием светодиода.

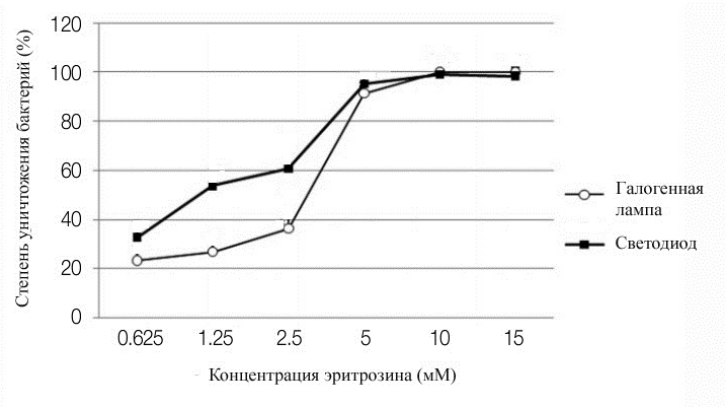


Рис. 2. График зависимости степени уничтожения Streptococcusmutans в зависимости от концентрации эритрозина [4].

Таким образом, эритрозин является эффективным фотосенсибилизирующим агентом для фотодинамической терапии слизистых оболочек. Была показана его эффективность относительно Streptococcusmutans. Однако механизм фототоксического действия сенсибилизаторов универсален и может быть использован для других видов грамположительных бактерий. Грамотрицательные бактерии также являются чувствительными к фотодинамическому воздействию эритрозина, но в меньшей степени из-за особенности строения их клеточных стенок.

Список использованной литературы

1. Красновский А.А. Синглетный молекулярный кислород и первичные механизмы фотодинамического действия оптического излучения. // Итоги науки и техники. Совр. пробл. лаз.физ. М.: ВИНИТИ, 1990. Т. 3. – 64-128 с.

2. Шинкаренко Н.В., Алесковский В.Б. Синглетный кислород, методы получения и обнаружения. // Успехи химии. М: Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук, 1981. Т. 50, № 3. – 406-428 с.

3. Гладков А. Люминесцентный анализ в медицине / А. Гладков. – Кишинев: Государственное издательство Молдавии, 1958. – 312 с.

4. The effect of photodynamic therapy on the viability of Streptococcus mutans isolated from oral cavity. / J. Jung, H. Park, J. Lee [et al.] // J Korean AcadPediatr Dent. – 2012. – Vol.39, №3– P. 233-240.

УДК 574.2

ЗОЛЬНЫЙ ОСТАТОК ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА КАК ИНДИКАТОР ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

Дериглазова М. А,
научный руководитель доктор геол.-минерал. наук Рихванов Л. П.
Национальный исследовательский Томский политехнический университет

Одним из важнейших направлений развития экологии в настоящее время является мониторинг экологического состояния городов. Техногенная нагрузка на некоторые урбанизированные территории России достигает своего предела, вызывая тяжелые последствия для представителей городских экосистем, в том числе и для человека. При этом мониторинг городских территорий в лучшем случае ограничивается исследованием качества атмосферного воздуха, почв, воды, а в редких случаях исследованием состояния растительности. Следует отметить, что при этом практически не изучается влияние экологической обстановки города на человека и его здоровье, за исключением случаев статистической обработки данных по заболеваемости органов дыхания, пищеварения, а также сердечно-сосудистой и нервной систем, имеющих некоторую зависимость с состоянием окружающей среды. Именно поэтому в данной работе был сделан упор на исследование состояния человека в условиях определенной окружающей среды. Загрязнение окружающего воздуха, почвы, воды объектами техногенеза ведет к определенным изменениям в организме человека, в том числе, как нам кажется, и в его химическом составе. Для проверки этой гипотезы был использован следующий вид материала – зольный остаток организма человека (ЗООЧ).

Зольный остаток организма человека представляет собой материал, оставшийся после сжигания тела человека в крематории. С одной стороны такой материал представляет данные о совокупном химическом составе человеческого тела, что делает его уникальным. Однако, с другой стороны, данный материал имеет свои недостатки, выражающиеся в трансформации исходного вещества, которые ведут к потерям определенных элементов при сжигании (As, Hg, Br и др.). 103 проб ЗООЧ были отобраны в 5 городах России: Санкт-Петербурге, Екатеринбурге, Ростове-на-Дону, Новосибирске и Новокузнецке. С помощью инструментального нейтронно-активационного, масс-спектрометрического анализа и электронной микроскопии нами были получены данные о содержании 63 химических элементов в организме человека и о некоторых формах их нахождения.

Однако, для того, чтобы анализировать полученные данные необходимо провести статистический анализ исходных данных. Одним из видов статистической обработки результатов является корреляционный анализ имеющихся данных.

С помощью подсчета коэффициентов парной корреляции можно увидеть специфику зольного остатка организма человека. Подсчет коэффициентов парной корреляции Пирсона проводился с помощью программы Microsoft Excel для выборок двух городов (Новокузнецк, Новосибирск) и всей выборки в целом. Количество проб других городов составляет менее 30, поэтому подсчет коэффициентов для них не проводился. При анализе учитывались выборки только тех элементов, большая часть которых (70% и более) определена значимо, то есть выше предела обнаружения.

Зольный остаток организма человека жителя Новосибирска характеризуется значимыми положительными коэффициентами корреляции (значимый коэффициент = 0,296 для 30 проб при уровне ошибки p=0,05) для следующих пар элементов:

- От 0,7 до 0,6: Sc-Na, Ba-Sb;

- От 0,5 до 0,4: Fe-Ca, Au-Cr;
- От 0,4 до 0,3: Co-Cr, Zn-Cr, La-Ca, Au-Co, Au-Zn;

а также отрицательными для следующих пар:

- От 0,5 до 0,4: Zn-Ca
- От 0,4 до 0,3: Ca-Na, Na-La.

По значимым коэффициентам была построена диаграмма корреляционных связей, которая позволяет наглядно увидеть положительные и отрицательные связи элементов, говорить о специфике зольного остатка организме человека жителя города Новосибирск.

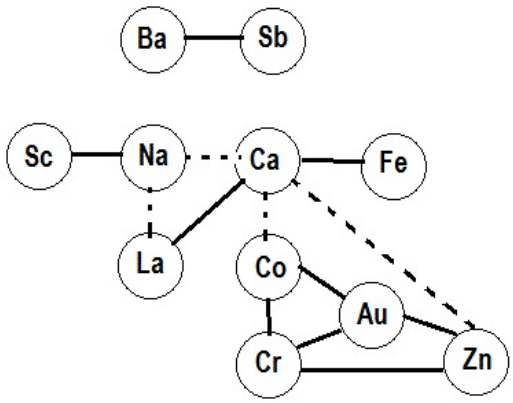


Рисунок 1. Диаграмма парных корреляционных связей для ЗООЧ г. Новосибирска(пунктиром показаны отрицательные связи)

Диаграмма наглядно показывает, что на территории есть несколько источников поступления химических элементов в ЗООЧ. Основным элементом, имеющим наибольшее число значимых корреляций, является кальций. Из рисунка видно, что кальций связывается с жизненно важными элементами для человеческого организма – натрием и железом. Однако в организме человека установлена отрицательная связь между железом и кальцием, так как они мешают усвоению друг друга в желудочно-кишечном тракте [1]. Это значит, что связь такого рода не связана с физиологическими особенностями организма. Кроме того, в нижней части диаграммы выделяется ассоциация нескольких элементов: кобальта, цинка, хрома, которые связаны золотом. Группа данных элементов указывает на возможное воздействие металлургического комплекса – в частности Новосибирского аффинажного завода и гальванического производства в пределах города.

Зольный остаток организма человека жителя Новокузнецка характеризуется значимыми положительными коэффициентами корреляции (значимый коэффициент = 0,275 для 36 проб при уровне ошибки p=0,05) для следующих пар элементов:

- От 0,9 до 0,8: Fe-Co, Ba-Na, Ba-Cr, La-Sb;
- От 0,8 до 0,7: Cr-Na, Cr-Sc, Sb-Zn, Eu-Zn;
- От 0,7 до 0,6: Sc-Na, Ba-Sc, La-Sc, La-Cr ;
- От 0,6 до 0,5: Zn-Sc, Na-Br, Sb-Sc, La-Zn, Eu-Sb;
- От 0,5 до 0,4: Cr-Co, Br-Sc, Rb-Na, Sb-Cr, Ba-Br, La-Ba, Sm-Sc, Sm-Sb
- От 0,4 до 0,3: Ba-Rb, Ba-Sr, La-Na, Sm-La, Eu-Sc, Eu-La;

- От 0,3 до 0,2: Fe-Cr, Co-Sc, Sm-Sr, Eu-Sm;

а также отрицательными для следующих пар:

- От 0,4 до 0,3: Br-Ca, Ba-Fe.

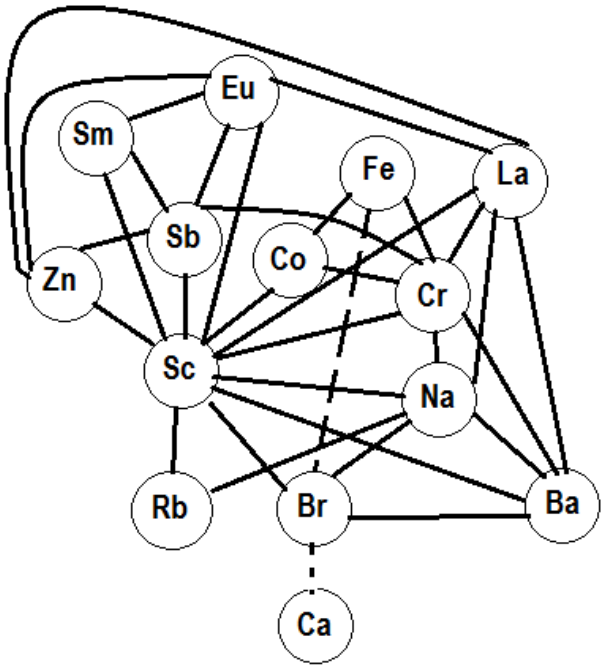


Рисунок 2. Диаграмма парных корреляционных связей для ЗООЧ г. Новокузнецка (пунктиром показаны отрицательные связи)

Из рисунка видно, что коэффициенты парной корреляции ЗООЧ г. Новокузнецка в большей степени отражают промышленную специфику города. В центре данной схемы располагается скандий, соединяя между собой 11 элементов.

Кроме того, четко выделяются группы железа, кобальта, хрома, скандия, брома, натрия и бария, скандия, самария, европия, сурьмы и другие. В схеме связываются элементы, входящие в состав различных сплавов: скандий – добавка в алюминиевые сплавы, железо и кобальт, имеющие самый высокий коэффициент корреляции – 0,88, а также хром – в чугуне и стали [2]. Очевидно, что такие ассоциации указывают на металлургическое производство на территории города Новокузнецк, которое является основой его промышленности.

Корреляционный анализ всей выборки в отличие от аналогичного анализа выборок отдельных городов, позволяет увидеть особенности, больше связанные с физиологией организма человека, чем с влиянием промышленности.

Вся выборка характеризуется значимыми положительными коэффициентами корреляции (значимый коэффициент = 0,164 для 103 проб при уровне ошибки p=0,05) для следующих пар элементов:

- От 0,5 до 0,4: Sc-Na, Ba-Na, Ba-Cr, Eu-La, Au-Cr, Au-Co;
- От 0,4 до 0,3: Cr-Ca, Cr-Na, Co-Cr, Zn-Sc, Sb-Cr, Sb-Zn, Ba-Sb, Ce-Zn, Eu-Cr, Eu-Sc;
- От 0,3 до 0,2: Cr-Sc, Sb-Zn, Ba-Ca, La-Cr, Ce-Sc, Ce-La, Sm-Ce, Eu-Na, Eu-Zn;
- От 0,2 до 0,1: Fe-Cr, Co-Na, La-Sc, Ce-Na, Sm-Zn,

а также отрицательными, для следующих пар:

- От 0,3 до 0,2: Eu-Ca,
- От 0,4 до 0,3: Sc-Ca,
- От 0,2 до 0,1: Au-Ca.

Как видно, анализ всей выборки не характеризуется высокими значениями коэффициентов корреляции, максимальный коэффициент характерен для пары лантаноидов европий - лантан и составляет 0,47.

Графический анализ парных связей (рисунок 3), тем не менее, указывает на металлургическую ассоциацию элементов (Co, Fe, Cr, Au). Это может быть связано с тем, что в каждом из исследуемых городов присутствует одно или несколько металлургических предприятий.

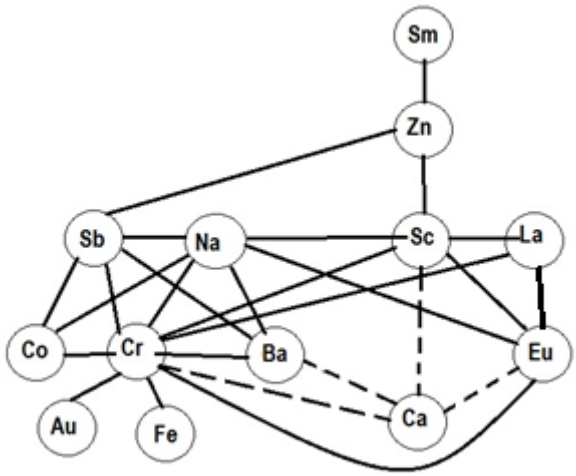


Рисунок 3. Диаграмма парных корреляционных связей для всей выборки ЗООЧ (пунктиром показаны отрицательные связи)

В центре схемы располагается хром, связывая 8 элементов, широко использующихся при изготовлении сплавов и обработке металлических конструкций [2]. Довольно сильно связан с другими элементами натрий. Он соединяет 6 элементов, в числе которых барий, сурьма и скандий. Также много связей имеет и европий. Кальций и барий связаны отрицательной связью, что может указывать на их нахождение во второй группе. Элементы из одной группы могут заменять друг друга, так как обладают схожими химическими свойствами, например, такой связью обладают в организме человека кальций и стронций [2]. Следует обратить внимание, что связи золото – хром и золото – кобальт, прослеживающиеся в Новосибирске, наблюдаются и здесь, причем коэффициент корреляции увеличивается для всей выборки.

Список литературы

1. Дроздов В.Н. Эффективность всасывания железа при раздельном и одновременном приеме с кальцием // Дроздов В.Н.., Носкова К.К., Петраков А.В - Терапевт. 2007. № 9. С. 47–51.

2. Барашков Г. К Медицинская бионеорганика. Основы, аналитика, клиника. – М: БИНОМ, 2011. –512 с.

УДК 577.175.14:616.36.008.5

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА В ДИНАМИКЕ

Н.Г. Елманова[1], Е. А. Коляда[2]
научные руководители: д.м.н. О.В. Смирнова[1,2], к.б.н. Н.М. Титова[2],
[1]ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск
[2]Сибирский Федеральный Университет

Механическая желтуха – тяжелейшее состояние организма, развивающееся вследствие нарушения естественного оттока желчи из печени в 12-перстную кишку. Наиболее частой причиной доброкачественной механической желтухи является желчнокаменная болезнь, а у злокачественного варианта – опухоли гепатопанкреатодуодональной зоны.

Этиологически механическая желтуха может быть доброкачественного (60-80 %) и опухолевого генеза (20-40 %)[12,[13]]. Наиболее частой причиной МЖ доброкачественного генеза является желчекаменная болезнь, которая по оценкам разных авторов диагностируется до 10 % взрослого населения развитых стран. Данные опубликованные зарубежными и отечественными хирургами, показывают, что синдром МЖ возникает у 15-40% больных с желчнокаменной болезнью (ЖКБ) и у всех больных, имеющих опухолевое поражение желчных путей. [3].

Кроме этого, для МЖ высокий уровень инфекционных осложнений является характерно особенностью. И несмотря на развитие и применение новых высокотехнологических методов диагностики, на внедрение в практическую медицину более совершенных способов лечения, летальность при этой патологии остается высокой и достигает 10-30%.

Цитокины – это высокоактивные соединения пептидной природы, которые играют роль антигенспецифических факторов. Клетками синтезирующие цитокины являются лимфоциты, так же к их синтезу способны макрофаги, эндотелиальные клетки ретикулярные фибробласты, гранулоциты и т.д. Цитокины подразделяют на провоспалительные, противовоспалительные, цитокины регулирующие клеточный иммунный ответ и цитокины регулирующие гуморальный иммунный ответ. К провоспалительным цитокинам относятся интерлейкины 1, 2, 6, 8, ФНО-альфа, интерферон-гамма. К противовоспалительным цитокинам относятся интерлейкины 4, 10 и ФНО-бета. Итерлекины 1, 12, интерферон-гамма и трансформирующий ростовой фактор-бета относятся к цитокинам регулирующим клеточный иммунный ответ. Интерлейкины 4 и 5 относятся к цитокинам регулирующим гуморальный иммунный ответ.

Интерлейкин 2 синтезируется Т-лимфоцитами. Стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов; повышает цитолитическую активность NK-клеток; стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов и секрецию иммуноглобулинов. Является медиатором воспаления.

Интерлейкин 4 синтезируется такими клетками как – Т-лимфоциты, макрофаги, тучные клетки, базофилы, В-лимфоциты, эозинофилы. Выполнят следующие функции: индуцирует дифференцировку CD4 Т-лимфоцитов в Th_2-клетки (Т-хелперы второго типа) и подавляет развитие Th_1 (Т-хелперов первого типа); стимулирует пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов; способствует продукции IgE В-лимфоцитами; различные эффекты на другие типы клеток, включая макрофаги и гранулоциты. Является противовоспалительным цитокином.

Новизна данной работы заключается в том, что впервые оценивается роль про- и противовоспалительных цитокинов в прогрессировании воспалительного процесса при механической желтухе в зависимости от того что явилось причина данного состояния, доброкачественный процесс или опухолевый.

В связи с этим, целью данного исследования явилось определение содержания про- и противовоспалительных цитокинов у больных механической желтухи различного генеза в динамике.

Исходя из поставленной цели, была сформулирована следующая задача – определить содержание интерлейкина 2 и интерлейкина 4 в крови больных механической желтухой различного генеза в предоперационное состояние и на седьмые сутки после операции

Было обследовано 25 больных МЖ в возрасте от 41 до 73 лет, поступившие в 1 хирургическое отделение ГКБ №6 в 2013г. Больные были разделены на две группы в зависимости от этиологии заболевания: больные механической желтухой опухолевого генеза (14 человек) и доброкачественного генеза (9 человек). Контрольную группу составили 125 практически здоровых лиц в возрасте от 25 до 70 лет, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой.

Материалом для исследования была кровь до хирургического вмешательства при поступлении больного в хирургическое отделение (10 мл) из локтевой вены, которая забиралась утром натощак, в вакутейнеры с добавлением раствора гепарина натрия (5 ЕД/мл).

Концентрация IL-2 и IL-4 в плазме крови у больных МЖ определялась с помощью метода иммуноферментного анализа (набор ОАО «Витал Девелопмент Корпорейшн»). Статистическая обработка данных поводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, USA). Описание выборки проводилось с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 процентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по критерию Манна-Уитни, при $p<0.05$.

У пациентов обеих групп перед операцией наблюдается повышение в восемь раз уровня интерлейкина 2 в крови по сравнению с практически здоровыми людьми, при этом хочу подчеркнуть отсутствие статистически значимого отличия между больными механической желтухой разного генеза.

Уровень интерлейкина 4 в крови больных опухолевого генез и доброкачественного генеза, напротив, был снижен примерно в 7 раз по сравнению с контрольной группой, при этом отсутствовала статистически значимое отличие между больными механической желтухой разного генеза.

Через семь суток после операции уровень интерлекина 2 в крови больных механической желтухой доброкачественного генеза вырос в 2,5 раза по сравнению с дооперационным уровнем и в 18 раз по сравнению с контрольной группой. У больных МЖ опухолевого генеза регистрируется снижение уровня интерлейкина 2 в крови как по сравнению с дооперационным уровнем, так и по сравнению с больными МЖ доброкачественного генеза после хирургического вмешательства.

После оказания оперативного пособия, на седьмые сутки, уровень интерлейкина 4 больных механической желтухой доброкачественного генеза оставался снижен по сравнению с практически здоровыми людьми, но наблюдается статистически значимое увеличение по сравнению с дооперационным значением. У больных МЖ опухолевого генеза на седьмые сутки наблюдается снижение уровня интерлейкина 4 как по сравнению с контрольной группой, так и с дооперационным уровнем.

Таким образом, у больных механической желтухой независимо от её генеза превалирует провоспалительный цитокин над противовоспалительным, что свидетельствует об активном воспалительном процессе.

После оперативного вмешательства соотношение пор- и противовоспалительных цитокинов зависит от этиологии основного заболевания. У больных механической желтухой доброкачественного генеза выявляется особенности цитокиновой регуляции клеток иммунной системы, направленные на восстановление иммунной реакции.

Список литературы

1. Абдулмуслимов А. М. Роль гепатопротекторов в коррекции функциий печени при механической желтухе // Автореферат. – 2014.

2. Данилов М. В., Глабай В. П., Кустов А. Е. и др. Хирургическое лечение больных механической желтухой опухолевой этиологии //Анналы хирургической гепатологии. - 1997. - Т. 2. - С. 110-116.

3. Gracanin AG, Kujundzić M, Petrovecki M, Romić Z, Rahelić D. Etiology and epidemiology of obstructive jaundice in Continental Croatia // Coll Antropol . - 2013. - 37(1). - P. 131-3.

4. Smirnova O.V., Manchouk V.T., Savchenko A.A. Immune status & enzymes activity in blood lymphocytes in adult patients at different stages of acute lymphoblastic leukaemia // Indian Journal of Medical Research. - 2011. -Т. 133, № 3. - P. 280-286.

УДК 57.017.35

СОЗДАНИЕ 3D-ФОРМ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПРЯМОГО ХОЛОДНОГО ПРЕССОВАНИЯ НА ОСНОВЕ ПЗГБ И МОДИФИКАЦИЯ ИХ ПОВЕРХНОСТИ CO_2- ЛАЗЕРОМ

Замниус В.В., Шумилова А.А
научный руководитель д. б. н. Волова Т. Г.
Сибирский Федеральный университет

Биомедицинская инженерия — это дисциплина, направленная на углубление знаний в области инженерии, биологии и медицины и укрепление здоровья человечества за счет междисциплинарных разработок, которые объединяют в себе инженерные подходы с достижениями биомедицинской науки и клинической практики.Существенных успехов удалось достичь в области разработки имплантатов, с помощью новых биоматериалов. В идеальном случае материал должен быть биологически совместимым с тканью, не отторгаться организмом как инородное тело, и быть биологически активным.

Современный метод прямого холодного прессования, применяется для изготовления изделий различных форм, размеров, преимущественно из реактопластов выпускаемых в виде порошков, гранул, армированных полимерных материалов, а также из резиновой смеси. Перед началом работы на прессе полимеры обрабатываются (сушка, таблетирование), улучшая тем самым качество получаемых изделий. Затем определенное количество перерабатываемого материала помещают в пресс-форму, установленную на прессе, далее пресс-форму смыкают.

Улучшение свойств поверхности материала (износостойкости, термостойкости, твердости, коррозионной стойкости), наряду с традиционными методами модификации (химическое травление, закалка, плазменная обработка, ударное упрочнение), в последнее время все чаще осуществляется методами лазерной модификации поверхности. Толщина обработанного слоя может составлять от сотен нанометров до нескольких миллиметров. Процесс лазерной модификации поверхности осуществляется путем сканирования поверхности материала лазерным пучком.Главные достоинства технологии лазерной модификации поверхности : локальность обработки, возможность обработки труднодоступных участков, химическая чистота, контролируемость толщины обработки, минимальная финишная доводка (или полное ее отсутствие), возможность дистанционного контроля и автоматизации процесса, малая пористость созданного поверхностного слоя, минимальное коробление обработанного изделия, высокая производительность процесса, высокая работоспособность созданного поверхностного слоя, существенное (в 2-5 раз) увеличение ресурса обработанных изделий.

Исходя из выше сказанного, целью - является конструирование и исследование полимерных имплантатов на основе поли-3-гидроксибутират, полученных методом прямого холодного прессования.

Материалы и методы исследования.

Для получения 3D-прессованных форм, использовали порошок гомополимера поли-3-гидроксибутирата (ПЗГБ):, который был получен в процессе культивирования бактерий Ralstonia eutropha на базе биомедицинского центра Сибирского Федерального Университета. Фракционный состав полимера (12 г) исследовали с помощью просеивающей машины AS 200 control (Германия), используя 4 режима фракционирования: 1) Амплитуда - 1.5; интервал 20сек ;время 3 мин.; 2) Амплитуда - 2; интервал 20 сек; время 3 мин.; 3) Амплитуда - 1.5; интервал 20 сек; время 10 мин. 4)

Амплитуда 2; интервал 20сек; время 10 мин. Насыпную плотность определяли с помощью тестера насыпной плотности PT-TD200 (Германия). Таблетированные матриксы, получали на прессе Carver Auto Pellet 3887, при силе прессования: 14 000 F, временя выдержки 15с. Поверхностные характеристики полимерных изделий оценивали с помощью прибора для измерения краевых углов DSA-25E (Krüss, Германия) с использованием программного обеспечения DSA-4 для Windows. просила изменить или сократить). Физико-механические свойства полимерных изделий изучали с использованием универсальной испытательной машины Instron 5565, 5KN фирмы (Великобритания) при комнатной температуре. Прессованные 3D имплантаты, обрабатывали CO2-лазером (LaserProExplorer II) в режиме растровой и векторной гравировки, при мощности v=4%, скорости P= 100%, разрешении (dpi=1000).

Результаты

Технологические свойства порошкообразных материалов, такие как фракционный состав и насыпная плотность, оказывают определенное влияние на сыпучесть, на стабильную массу таблетированной формы и ее качественные характеристики (внешний вид, прочность). В работе исследованы и отработаны режимы фракционирования гомогенизированного порошка поли-3гидроксибутирата, при использовании режимов 1 и 2 было установлено, что фракции 100мкм особо не отличаются друг от друга 7,15мг и 7,61г соответственно, а фракции 20-40 мкм сильно отличаются 1,33мг и 0,44мг. При использовании режимов 3 и 4 были получены фракции 100мкм 7,2г и 8,4г, в то время как фракции 20-40мкм не сильно отличаются 1г и 0,9мг. Исходя из вышеуказанных результатов, для последующего прессования были взяты две фракции П3ГБ размером 100 мкм и 20-40 мкм, полученные при 4 режиме фракционирования.

Заключение было сделано, по исследованию качества рассева и потери исходного материала. Насыпная плотность фракции с размером 100 мкм составила 13.7 %, фракции с размером частиц 20-40 мкм 5, 8 %.

Методом холодного компактного прессования получена серия таблетированных форм, диаметром 13 мм, массой 100 мг. Физико-механические свойства полимерных изделий определяли с помощью модуля юнга. Модуль юнга фракции 100мкм на 20% меньше фракции 20-40мкм.

Для последующей модификации поверхности, выбраны прессованные формы из фракции П3ГБ размером частиц 100 мкм. Обработка проведена в режиме растровой и векторной гравировки, при мощности v=4 %, скорости P= 100 %, разрешении (dpi=1000). В процессе обработки варьировали параметры луча диаметр (D) и высота (h): 1) D=0,05 мм, h=0,25 мм; 2) D=0,05 мм, h=1,0 мм. Лазерная резка полимерных изделий в исследованных режимах сопровождалась формирование сквозных перфораций по всей поверхности. В зависимости от диаметра и высоты лазерного луча обнаружены варьирования диаметра пор и расстояние между ними. Так, при D=0,05 мм, h=1,0 мм расстояние между порами составило порядка 600 мкм, а при D=0,05 мм, h=0,25 мм значительно меньше (100 мкм). Самые мелкие поры (100 мкм) получены при обработке лучом D=0,05 мм, h=0,25 мм; самые крупные (300 мкм) – при D=0,05 мм, h=1,0 мм.

Таким образом сконструировано и исследовано семейство экспериментальных изделий в виде прессованных матриксов, доказаны высокие медико-биологические свойства изделий, устойчивость к воздействию биологических и физико-химических факторов. Выбран оптимальный режим фракционирования. Установлено, что матриксы полученные при силе 14000, наиболее пригодны для дальнейшего использования. Доказана применимость метода прямого холодного прессования для разработки полимерных конструкций.

УДК: 616-006.81.04

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ С РАЗЛИЧНОЙ КАЛОРИЙНОСТЬЮ НА ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У МЫШЕЙ С МЕЛАНОМОЙ

Родин В.В., Бартицкая О.И., Курченко А.Е.
научный руководитель канд. биол. наук Титова Н.М.
Сибирский федеральный университет

Меланома - опухоль, развивающаяся из меланоцитов и пограничных невусов. Высокий уровень заболеваемости меланомой является одной из актуальных проблем современной онкологии. В настоящее время широкое признание получила свободнорадикальная теория канцерогенеза, согласно которой активные формы кислорода (АФК) и продукты свободнорадикального окисления биологических молекул являются основными патогенетическими факторами в опухолевой трансформации тканей. Помимо деструктивной роли АФК выполняют и физиологические функции: в качестве сигнальных молекул они вовлечены в процессы роста, пролиферации и апоптоза клеток. В организме существует система антиоксидантной защиты (АОС), которая обеспечивает контроль окислительных реакций и инактивацию всего многообразия токсичных свободнорадикальных продуктов, в том числе и АФК, в избытке образующихся при канцерогенезе (1). Борьба с опухолевыми заболеваниями направлена, с одной стороны, на уничтожение самой опухоли, а с другой – на нормализацию любыми средствами тканевого метаболизма в организме. Одним из подходов к решению этих проблем является использование диет с ограниченной калорийностью. Согласно данным, приведенным в литературе, в экспериментах на мышах, получавших диету с ограниченной калорийностью, показано значительное замедление роста опухолей (2, 3).

Цель данной работы – исследование влияния диеты с ограниченной калорийностью на окислительную модификацию липидов и белков и состояние антиоксидантной системы в гепатоцитах мышей с меланомой.

Материалы и методы.

Исследование было проведено на мышах линии $C_{57}B_{16}$. Объектом исследования служили гомогенаты печени нескольких групп мышей (табл. 1).

Таблица 1. Экспериментальные группы мышей

Мыши	Дизайн эксперимента
1 группа	Мыши без опухоли на базовой диете (без ограничения калорийности - получали корм согласно физиол. потребностям) в течение 21 дня.
2 группа	Мыши без опухоли, диета с ограничением калорийности на 30% в течение 21 дня
3 группа	Мыши с опухолью содержались на диете с ограничением калорийности на 30% в течение 21 дня
4 группа	Мыши с опухолью с диетой базовой (без ограничения калорийности, мыши получали корм "Чара" - полностью удовлетворялись физиологические потребности в энергии, и всем макро-, микронутриентам и минорным компонентам пищи).

В гомогенатах определяли содержание малонового диальдегида (МДА) – маркера перекисного окисления липидов (ПОЛ), карбонильных производных белков (КПБ) и активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы. Содержа-

ние МДА оценивали по его реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, в результате которой образуется окрашенный комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм (Ko, Godin, 1990). Метод определения карбонильных производных белков (КПБ) основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразонов, интенсивность окраски которых регистрировали при длине волны 370 нм (Oliver et al., 1987). Принцип определения активности супероксидисмутазы (СОД) основан на ингибировании реакции окисления адреналина в щелочной среде в присутствии супероксиддисмутазы при длине волны 347 нм (Сирота Т. В., 1999). Активность каталазы (КАТ) определяли по скорости образования окрашенного желтого комплекса неразрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония (Королюк и др., 1988). Функциональная активность печени оценивалась по активности аланин- и аспартатаминотрансфераз – АЛТ, АСТ. Содержание белка определяли микробиуретовым методом (4).

Для обработки данных полученных результатов использовались программы Statistica 8 и Microsoft Office Excel 2007 в Windows XP. Обработку данных проводили с помощью подсчета медианы, интервального разброса (С25-С75 процентели). Проверку гипотезы о статистической достоверности величин исследуемых показателей несвязанных выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни

Результаты исследования и их обсуждения.

Было проведено сравнительное исследование содержания МДА, карбонильных производных белков, активности антиоксидантных ферментов – СОД, КАТ и ферментов, участвующих в белковом обмене – АСТ и АЛТ, в гомогенатах печени мышей с меланомой при различных видах диет (базовая диета и диета с ограниченной калорийностью). Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание МДА, КПБ и активность ферментов в печени мышей с меланомой на фоне диет с различной калорийностью

Показатель	1 группа (n=8)	2 группа (n=19)	3 группа (n=10)	4 группа (n=10)
	Me, C_{25}-C_{75}	Me, C_{25}-C_{75}	Me, C_{25}-C_{75}	Me, C_{25}-C_{75}
МДА мкмоль/г белка	2,55 1,40-5,00	2,10 1,40-2,70	5,91 3,90-7,41 $p_2 < 0.01$	4,20 3,68-4,57
КПБ мкмоль/г белка	4,05 2,20-4,50	5,80 3,20-6,40	3,40 1,00-6,50	17,70 12,90-22,90 $p_1 < 0.05$ $p_3 < 0.01$
СОД у.е/мин*г белка	1349 1279-1479	1436 1225-1572	1544 1340-1576	1305 1188-1522
КАТ ммоль/мин * г белка	268 256-289	293 253-300	291 287-292	263 260-266 $p_3 < 0.01$
АСТ мкмоль/(ч*г белка)	0,41 0,38-0,42	0,50 0,39-0,51	0,59 0,58-0,63 $p_2 < 0.01$	0,54 0,53-0,56 $p_1 < 0.01$
АЛТ мкмоль/(ч*г белка)	1,94 1,63-2,37	1,19 0,53-2,18	3,06 2,99-3,12 $p_2 < 0.01$	1,92 1,84-1,97 $p_3 < 0.01$

Примечание: p_1 – достоверность по сравнению с 1 группой, p_2 – достоверность по сравнению со 2 группой, p_3 – достоверность различий показателей у мышей с меланомой (диета с различной калорийностью).

Повышение концентрации малонового диальдегида в печени мышей с меланомой наблюдалось при диете с ограниченной калорийностью – на 182% и на 65% у мышей, содержащихся на диете без ограничения калорийности по сравнению с соответствующими показателями в контрольных группах (группы 1 и 2). Высокий уровень малонового диальдегида – вторичного продукта перекисного окисления липидов служит косвенным доказательством гиперпродукции АФК у мышей с меланомой. MDA – высокореакционный метаболит, способный модифицировать азотистые основания в молекуле ДНК, образовывать Шиффовы основания с такими аминокислотами в белках, в том числе и ферментах, как гистидин, лизин, цистеин, приводя к потере биологических свойств биомолекул.

Маркером окислительной модификации белков служат карбонильные производные. Карбонильные производные увеличиваются и снижаются вследствие повышения или понижения неферментативного дезаминирования боковых групп аминокислотных остатков в белковых молекулах. У мышей с меланомой многократное повышение КПБ наблюдалось при диете без ограничения калорийности, напротив, в гепатоцитах мышей, содержащихся на диете с ограниченной калорийностью, уровень КПБ не отличался от контрольных показателей.

Активность супероксиддисмутазы и каталазы, ферментов, устраняющих супероксидные анион-радиакалы и пероксид водорода, у мышей с меланомой, как без ограничения, так и при ограничении диеты по калорийности, не отличалась от соответствующих показателей в контрольных группах животных.

Активность аминотрансфераз, участвующих в процессе переаминирования аминокислот, достоверно повышена в гепатоцитах мышей с меланомой: при диете без ограничения калорийности на 32%, при ограниченной по калорийности диете – на 18% по сравнению с контрольными величинами.

Сравнительный анализ исследуемых показателей в печени мышей с меланомой, содержащихся на диете с различной калорийностью, показал достоверные различия в окислительной модификации липидов и белков, тенденцию к повышению активности антиоксидантных ферментов и аспартатаминотрансферазы, а также достоверное и существенное повышение активности аланинаминотрансферазы у мышей на фоне диеты с ограниченной на 30% калорийностью.

Список используемой литературы

1. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, И.А. Бондарь, В.А. Труфакин. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.

2. Hursting, S.D. Calorie restriction and cancer prevention: a mechanistic perspective / S.D. Hursting, S.M. Dunlap, N.A. Ford, et al. // Cancer & Metabolism. – 2013. – V. 1(10). – P. 1 – 11.

3. Longo, V.D. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms /V.D. Longo, L. Fontana // Trends Pharmacol. Sci. – 2010. – V. 31(2). – P. 89–98.

4. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практическим занятиям /сост.: Титова Н.М., Замай Т.Н., Субботина Т.Н., Савченко А.А. – Красноярск: ИПК СФУ 2009. – 60 с.

УДК 616.33-002.27

ПРООКСИДАНТНО/АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС КРОВИ БОЛЬНЫХ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ

Костина Е.С., Круглякова М.В.
научный руководитель канд. биол. наук Титова Н.М.
Сибирский федеральный университет

Атрофический гастрит – это разновидность гастрита, для которой характерным является истончение слизистой оболочки стенок желудка, в связи, с чем происходит уменьшение выработки желудочного сока. Уменьшается также количество эпителиальных клеток, которые участвует в регенерации слизистой желудка. После чего происходит формирование секреторной недостаточности желудка [1].

Гастрит относится к широко распространенным заболеваниям, поражает более 40-50% взрослого населения земного шара. Среди заболеваний органов пищеварения он составляет около 35% , а среди заболеваний желудка - 60-85%. Частота изменений слизистой оболочки при гастрите и их выраженность повышаются с возрастом больного. Частота хронического гастрита среди населения с каждым годом жизни возрастает на 1,4% [2].

В состоянии физиологического оптимума антиоксидантный статус организма характеризуется равновесием между двумя противоположными составляющими: уровнем свободно-радикального окисления и активностью антиоксидантной защиты. В обычных условиях это равновесие удерживает перекисное окисление на определенном низком уровне, препятствуя развитию цепных окислительных процессов [3]. Прогрессирование атрофического гастрита может сопровождаться дисбалансом в про- и антиоксидантной системах организма с преобладанием процессов окислительной модификации биомолекул. Это может усиливать повреждение не только слизистой оболочки стенок желудка, но и оказывать негативное влияние на другие ткани. Знание про- и антиоксидантного статуса крови важно не только для понимания патогенетического механизма развития атрофического гастрита, но и для терапии и профилактики данной патологии.

Цель работы – изучить характер изменения содержания продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида и состояния антиоксидантной системы в крови больных атрофическим гастритом.

Материалы и методы.

В исследовании приняли участие 43 человека с атрофическим гастритом и практически здоровые люди (контрольная группа, 28 человек). Объектом исследования послужили эритроциты и плазма крови. Показателем прооксидантной системы служил уровень малонового диальдегида (МДА) – продукта перекисного окисления липидов. Состояние антиоксидантной системы (АОС) оценивали по активности ферментов – супероксиддисмутазы (SOD), каталазы, глутатионпероксидазы (GPO), глутатион-S-трансферазы (GST), содержанию неферментативных компонентов АОС – церулоплазмина, восстановленного глутатиона (GSH) и мочевой кислоты [4].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха (C_{25} и C_{75}). Проверку гипотезы о статистической достоверности полученных результатов проводили согласно критерию Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение.

Известно, что при ряде патологических состояний, сопровождающихся развитием оксидативного стресса, интенсифицируются процессы перекисного окисления липидов и повышается уровень малонового диальдегида. При атрофическом гастрите нами выявлено достоверное повышение содержания MDA как в эритроцитах, так и в плазме.

У больных атрофическим гастритом в эритроцитах содержание MDA достоверно превышает контрольный показатель на 171%, в плазме крови – на 200%. Это может служить косвенным подтверждением увеличения уровня активных форм кислорода, запускающих не только процессы ПОЛ, но и окислительной модификации других биомолекул: ДНК, белков и углеводов.

Также нами было установлено, что при атрофическом гастрите в эритроцитах возрастает активность GPO и GST – на 51% и 246% соответственно (табл. 1), в плазме наблюдалась тенденция к повышению активности GST на 34% (табл. 2), по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. Вероятно, снижение уровня восстановленного глутатиона связано с тем, что он интенсивно используется как субстрат для большинства окислительных процессов в клетке, которые, в частности, катализируются GPO и GST.

В эритроцитах больных атрофическим гастритом отмечается снижение активности ферментов, устраняющих супероксидный анион-радикал и пероксид водорода – SOD и CAT. Степень выраженности снижения активности одинаковая, так активность SOD снижается на 17%, CAT – на 12%, по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы (табл.1).

Снижение активности антиоксидантных ферментов, по-видимому, обусловлено либо модификацией белковой молекулы малоновым диальдегидом, либо непосредственным ингибированием активными формами кислорода.

Таблица 1. Содержание MDA, GSH и активности ферментов АОС в эритроцитах у здоровых людей и больных атрофическим гастритом

Показатель	Контроль (n=28)		Больные (n=38)	
	Me	C25-C75	Me	C25-C75
MDA мкмоль/гHb	1,72	1,44-2,46	4,66	3,94-5,29 (p< 0,01)
SOD у.е./мин*гHb	1508	1248-1632	1217	1128-1420 (p< 0,01)
Каталаза ммоль/мин*гHb	286	247-327	255	225-278 (p< 0,05)
GSH мкмоль/гHb	2,32	1,64-3,00	1,93	1,59-2,38
GPO мкмоль/мин*гHb	77,20	66,80-101,00	116,22	104,16-132,57 (p<0,01)
GST ммоль/мин/гHb	2,34	2,22-2,83	8,09	6,48-10,49 (p< 0,01)

В плазме крови больных атрофическим гастритом наблюдается снижение содержания церулоплазмина и мочевой кислоты, на 30% и 13,5% соответственно (табл.2).

Церулоплазмин является внеклеточным антиоксидантом, обеспечивающим супероксиддисмутазную и ферроксидазную активность. Являясь «перехватчиком» свободных радикалов, он предохраняет липопротеины плазмы крови от повреждения. Тенденция к снижению содержания церулоплазмина можно рассматривать, как показатель ослабления антиоксидантной защиты организма. Мочевая кислота является одним из важнейших антиоксидантов плазмы крови, на ее долю приходится 2/3 от

общей антиоксидантной активности плазмы. Снижение содержания мочевой кислоты приводит к повышению уровня активных форм кислорода, следствием чего является интенсификация процессов перекисного окисления липидов и уровня вторичного продукта этих процессов - МДА.

Таблица 2. Содержание MDA и активность АОС в плазме крови здоровых людей и больных атрофическим гастритом

Показатель	Контроль (n=28)		Больные (n=43)	
	Me	C25-C75	Me	C25-C75
MDA мкмоль/г белка	1,57	1,20-2,74	5,29	4,39-6,07 (p_1<0,05)
GST ммоль/мин/г белка	42,35	37,5-52,00	56,99	31,52-73,46
Церулоплазмин мг/л	250	218-276	174	130 -248
Мочевая кислота мкмоль/л	317	293-332	274	228-309 (p_1<0,05)

Таким образом, характерными особенностями метаболических сдвигов в крови больных атрофическим гастритом являются: недостаточность антиоксидантной системы, на что указывает высокий уровень МДА, косвенно отражающий гиперпродукцию АФК, снижение уровня восстановленного глутатиона, мочевой кислоты и церулоплазмина. Активность антиоксидантных ферментов изменяется по-разному. Активность СОД и каталазы у людей больных атрофическим гастритом снижается, по сравнению со здоровыми людьми, активность GPO и GST возрастает. Несмотря на возросшую активность глутатионзависимых ферментов – глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, участвующих в детоксикации перекиси водорода и липоперекисей, уровень малонового диальдегида, продукта окислительной модификации ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов мембран эритроцитов и липопротеинов плазмы крови остается повышенным.

Список использованных источников

1. Колодей Е.Н. Актуальные вопросы диагностики и лечения гастрита типа В // Мир фармации и медицины. – Нижний Новгород – 2012 - № 22.

2. Цуканов В.В. Распространенность атрофического гастрита тела желудка у населения г. Красноярска старше 45 лет / В.В. Цуканов, О.В. Третьякова, О.С. Амельчугова, Э.В. Каспаров, Д.В. Родина, А.В. Васютин, Н.Н. Буторин, Ю.Л. Тонких // РЖГГК. - 2012 - Т.22,№4. - С.27-31.

3. Полунина О. С. Международная научная конференция «СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ, АНТИОКСИДАНТЫ И СТАРЕНИЕ» / *О. С. Полунина, П. А. Доновский, Г. В. Орман, И. А. Кудряшева* // Сборник трудов Астраханской государственной медицинской академии. – 2006 - Том 37 (LXI).

4. Титова Н.М. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практических занятиям / сост.: Н.М. Титова, Т.Н. Замай, Т.Н. Субботина, А.А. Савченко. – Красноярск: ИПК СФУ. – 2009 – 60с.

УДК 575.224.22

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА RS17244841 ГЕНА HMGR В СИБИРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Котловский М.Ю., Оседко А.В., Оседко О.Я., Покровский А.А., Котловская О.С., Якименко А.В., Курдояк Е.В., Котловский Ю.В.

Научный руководитель д-р мед. наук Дыгай А.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

3-гидрокси-3-метилглютарил-кофермент А редуктаза (*HMG-CoA reductase, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase, HMGR, HMGCR*) — фермент, катализирующий синтез мевалоновой кислоты, лимитирующую стадию метаболического пути синтеза холестерина и других изопреноидов. Данный фермент является мишенью лекарств, снижающих уровень холестерина - статинов. Ген HMGCR находится на хромосоме 5 q13.3–q14 [1], состоит из 20 экзонов, кодирует белок, состоящий из 888 аминокислот. Полиморфизм гена HMGCR rs17244841, также известный как SNP 12, расположен в гене HMG-CoA. Вариации аллелей данного полиморфизма в гене HMGCR могут повлиять на результаты терапии статинами.

Целью нашей работы являлось определение частоты встречаемости генотипов полиморфизма rs17244841 гена HMGR в группе относительно здоровых людей и в опытной группе, проанализировать полученные результаты на соответствие распределению Харди-Вайнберга.

В данной работе реализован подход определения однонуклеотидного полиморфизма rs17244841 гена HMGR, в основе которого лежит проведение реакций минисеквенирования с последующей масс-спектрометрией продуктов реакций (матричная лазерная десорбционно-ионизационная масс-спектрометрия на времяпролетном масс-спектрометре (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass-Spectrometry, MALDI-TOF MS)).В качестве клинического материала использовалась венозная кровь, взятая в стерильные пластиковые пробирки с добавлением антикоагулянта – EDTA. Для выделения ДНК был использован фенол-хлороформовый метод экстракции. Для контроля были отобраны относительно здоровые лица в количестве 177 человек (108 женщин, 69 мужчины), проживающие в городе Красноярске. Средний возраст женщин составлял 51,1±0,6, мужчин – 48,5±0,7 лет. Критериями включения для данной группы являлись: возраст – от 40 лет, отсутствие ИБС, отсутствие выраженных острых и хронических заболеваний в момент обострения, отсутствие тяжелых хронических заболеваний. Критериями исключения являлись: наличие ИБС, острые заболевания, хронические заболевания в стадии обострения, наличие сахарного диабета, нарушения липидного обмена, тяжелые нарушения функции печени и почек, артериальная гипертензия 3 степени. В качестве больных ИБС было отобрано 147 человека (64 женщины, 83 мужчин). Средний возраст женщин данной группы составлял 63,3±1,2, мужчин- 57,9±0,9 лет. Критериями включения для данной группы являлись: возраст - от 40 лет, пол - мужчины и женщины, верифицированный диагноз ИБС, наличие дислипидемии, добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения пациентов из исследования являлись: ИМ, прогресси-

рующая стенокардия, острое нарушение мозгового кровообращения, тромбоэмболия легочной артерии менее чем за 6 месяцев до обследования, стенокардия напряжения 3-4 функционального класса, тяжелые нарушения функции печени и почек, острые и хронические заболевания в стадии обострения, гипотиреоидизм, порфирия, миопатия, повышенная активность ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) более 3 верхних пределов норм и злоупотребление алкоголем.

Для каждого SNP проводили проверку на отклонение от ожидаемых результатов по Харди-Вайнбергу, оценка проводилось по критерию хи-квадрат с помощью онлайн калькулятора (http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml). Частоты генотипов при $\chi 2 < 3.84$ соответствуют равновесию Харди-Вайнберга.

Таблица 1. Распределение генотипов полиморфизма rs17244841.

rs17244841				Наблюдаемые		Ожидаемые по Харди-Вайнбергу		
Генотип	Кол-во	Аллель А	Аллель Т	Частота	%	Частота	%	P*
AA	306	612	0	306	94,44	306,25	94,52	
AT	18	18	18	18	5,56	17,50	5,40	
TT	0	0	0	0	0,00	0,25	0,08	
Всего	324	630	18	324	100,00	324,00	100,00	0,6071
Частота		0,97	0,03					$\chi 2$= 0.26

*P – уровень значимости

При проведении анализа данных полиморфизма rs17244841 гена HMGR в общей группе людей (опыт+контроль, 324 человека), мутантных гомозигот обнаружено не было, что обусловлено низкой частотой встречаемости в популяциях. В группе из 324 человек 306 человек имели генотип АА, что составляло 94,4%. С гетерозиготным вариантом АТ было выявлено 18 человек, что составило 5,5% от общей группы. Распределение генотипов данного полиморфизма соответствовало закону Харди-Вайнберга. Ожидаемые результаты по Харди-Вайнбергу для гомозиготы АА были 94,5% и для гетерозиготного варианта АТ – 5,4%. Полученные частоты распределения соответствуют данным, полученным в других исследованиях [3]. Частоты аллелей, генотипы и уровень значимости полиморфизма rs17244841 представлены в таблице 1. Полученные данные будут использоваться нами в дальнейшей работе по изучению эффективности терапии статинами.

Список использованных источников

1. Lindgren V., Luskey K.L. Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. P. 8567–8571.

2. Xu N1, Taylor KD, Azziz R, Goodarzi MO. Variants in the HMG-CoA reductase (HMGCR) gene influence component phenotypes in polycystic ovary syndrome. // Fertil Steril. 2010 Jun;94(1):255-60.e1-2.

3. Krauss RM, Mangravite LM, Smith JD. Variation in the 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme a reductase gene is associated with racial differences in low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin treatment. // Circulation. 2008 Mar 25;117(12):1537-44.

УДК 735.29

СОЗДАНИЕ КОМПОЗИТНЫХ МАТРИКСОВ

Максимов К. В.,
научный руководитель д-р биол. наук Шишацкая Е.И.
Сибирский федеральный университет

В современной регенеративной медицине актуален поиск различных биосовместимых материалов для клеточной и тканевой инженерии, в частности – для разработки и создания элементов биоискуственных органов, а так же для различных изделий медицинского назначения. Научно – изыскательская работа включает разработку новых биоматериалов и усовершенствование уже существующих, а так же создание композитов на основе различных групп материалов медицинского назначения. Поэтапная оценка на безопасность и биологическую совместимость проводится как по отношению к конкретному типу изделия, так и к его компонентам – материалам и композициям из них; она состоит из этапов санитарно-химических, технических и токсикологических испытаний, позволяющих выявить базовые свойства материала и изделия из него, а так же природу реакции организма на имплантируемый материал и изделие.

Цель работы: создание композитных матриксов на основе поли-3-гидроксибутирата и хитозана для инженерии костной и хрящевой тканей.

Для получения композита использовали поли-3-гидроксибутират – полиэфир микробиологического происхождения, который способен биодеградировать в природной среде с образованием нетоксичных продуктов, и хитозан – природный полисахарид, имеющий свойства хорошего катионида. Оба материала биосовместимы и обладают способностью к биодеградации. Композиции на их основе будут обладать расширенным спектром физико-механических свойств и потенциалом для решения задач биомедицины.

Для получения таблетированных трехмерных форм использовали материалы в виде порошков, в различных соотношениях по массе – П3Гб\хитозан как 90:10%, 80:20%, 70:30%, 60:40%, 50:50%. Гранулометрический состав порошковых материалов изучали с помощью просеивающей машины АС 200 control. Насыпную плотности полученных фракций измеряли с помощью тестера плотности утряски PT-TD200 PHARMA TEST (Германия). Диапазон измерений – 20 мкм – 25 мм, используется для разделения, фракционирования и определения размеров частиц. Прессованные композиты получали с помощью метода прямого холодного прессования на автоматизированном лабораторном прессе с возможностью нагрузки до 25 кН. Структуру поверхности полученных композитов изучали с помощью РЭМ. Определение характеристик поверхности композитов проводили на базе измерения контактного угла смачивания: (q, град); вычисляли свободную поверхностную энергию (γS), свободную энергию межфазовой поверхности (γSL) и величину сил сцепления (WSL) (эрг/см2), используя известные уравнения (Де Жен, 1985). Для определения контактных (краевых) углов смачивания водой образцы помещали на предметное стекло и с помощью автоматической микропипетки наносили на поверхность пленки капли дистиллированной воды объемом 100 мкл, по 3 каждого объема.

По результатам проделанных исследований полученные образцы композитных изделий на основе П3ГБ и хитозана обладают хорошей гидрофильностью, что важно для благоприятной реакции клеток макроорганизма и имеют потенциал для биологических применений.

УДК616.155.392-036.12

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИИ В ГЕНЕ КАЛЬРЕТИКУЛИНА И ЕГО ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

П.А. Николаева
научные руководители: А.С.Горбенко; канд. биол. наук, доц Т.Н.Субботина
Сибирский федеральный университет, г. Красноярск
Красноярский филиал ФГБУ ГНЦ МЗ РФ, г. Красноярск

Диагностика хронических миелопролиферативных заболеваний базируется на клинических симптомах, на морфологических картинах клеток крови и костного мозга. В последние годы все чаще используются молекулярно-генетические методы, позволяющие установить диагноз без необходимости пункции костного мозга. В конце 2013 года была обнаружена новая мутация в гене кальретикулина, связанная с развитием эссенциальной тромбоцитемиией и первичным миелофиброзом. Кальретикулин является многофункциональным кальций-связывающим белком эндоплазматического ретикулума. Кроме регуляции внутриклеточной концентрации кальция, этот белок принимает участие в формировании третичной структуры белка, обладая функцией шаперона. При его участии происходит образование полноценного антигенпрезентирующего макромолекулярного комплекса MHC1. Повышенная экспрессия кальретикулина сопряжена с успешной иммунной цитотоксической реакцией против опухолевых клеток и определяет благоприятный исход химиотерапии. Мутации c.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47) и c.1092_1143del (p.L367fs*46) обуславливают развитие клинической картины эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза и предлагаются в качестве обязательного лабораторного теста для подтверждения диагноза.

Целью настоящего исследования явилась разработка и сравнение методов определения мутаций в гене кальретикулина, определение диагностической значимости выявленных мутаций.

В качестве объекта исследования использовалась ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови пациентов с подозрениями на хронические миелопролиферативные заболевания. Для определения мутации в гене кальретикулина проводили ПЦР исследуемой области гена. Детекцию продуктов амплификации проводили электрофоретическим методом в агарозном геле. Для определения мутации c.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47) продукты амплификации перед электрофорезом обрабатывали рестриктазой MfeI.

Рестрикционный метод анализа с электрофоретической детекцией имеет ряд недостатков - продолжительное время анализа, невысокая чувствительность, дороговизна фермента рестрикции. Для преодоления этих недостатков нами был разработан метод детекции ПЦР в режиме реального времени с использованием зондов TaqMan.

Используя оба метода (форез и ПЦР-РВ), нами были обследованы пробы 274 пациентов с установленными диагнозами: истинная полицитемия (89 пациентов), эссенциальная тромбоцитемия (134 пациента) и первичный миелофиброз (51 пациент). Результаты сравнения разработанных методов по частоте выявляемых мутаций приведены в таблице 1.

Таблица 1. Сравнение разработанных методов по частоте обнаружения разных типов мутаций в гене кальретикулина

Метод	Количество	Дикий тип	c.1092_1143del (p.L367fs*46)	c.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47)	Прочие типы мутаций
Форез	274	232	27	10	5
ПЦР-РВ	274	237	27	10	0

Электрофоретическим методом детекции было обнаружено 42 мутации, 5 из которых не выявляются методом ПЦР в режиме реального времени. Связано это с особенностями метода ПЦР-РВ, позволяющим выявлять мутации только с заранее известной последовательностью. Таким образом, каждый из разработанных нами методов имеет свои преимущества и недостатки, что не дает возможности однозначно рекомендовать один из них. Для решения этой проблемы нами был предложен следующий алгоритм анализа: на первом этапе анализа для определения мутацийс.1092_1143del (p.L367fs*46) и c.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47) проводится ПЦР в режиме реального времени, что позволяет выявить эти мутации при низких аллельных нагрузках; на втором этапе анализа продукты амплификации, полученные на первом этапе, подвергаются электрофоретическому разделению с целью обнаружения прочих типов мутаций.

В таблице 2 приведены результаты о встречаемости мутаций в гене кальретикулина при хронических миелопролиферативных заболеваниях.

Таблица 2. Распределение частот встречаемости мутаций в гене кальретикулина у пациентов с различными вариантами хронических миелопролиферативных заболеваний

Диагноз	Без мутаций	c.1092_1143del (p.L367fs*46)	c.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47)	Прочие типы мутаций
Истинная полицитемия	89	0	0	0
Первичный миелофиброз	40	6 (12%)	4 (5%)	1 (2%)
Эссенциальная тромбоцитемия	103	21 (16%)	6 (8%)	4 (3%)

15,3% (42) пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями имеют мутацию в гене кальретикулина. Только у пациентов с диагнозами эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз были выявлены мутации. У пациентов с диагнозом истинная полицитемия мутаций в гене кальретикулина обнаружено не было. Встречаемость мутации в гене кальретикулина при эссенциальной тромбоцитемии и первичном миелофиброзе составляет 27% и 19% соответственно. Эти результаты показывают важность мутаций гена кальретикулина в развитии хронических миелопролиферативных заболеваний.

УДК 664

ФАСОЛЬ КАК ИСТОЧНИК МИКРОЭЛЕМЕНТА СЕЛЕНА

Омарова А.М.,Склярова А.А.
научный руководитель канд.биол.наук Усубова Е.З
Волгоградский государственный университет

Аннотация

Определено содержание селена флуориметрическим методом в семенах фасоли. Селен аккумулируется в семядолях семян фасоли. При прорастании семени фасоли концентрация селена снижается.

Ключевые слова: семена фасоли, селен, флуориметрический метод

В последние годы селеном заинтересовались физиологи, биохимики, медики и растениеводы. Известно, что селен входит в состав более 200 гормонов и ферментов и, соответственно, участвует в регуляции деятельности всех систем в организме. Ученые Института питания РАМН выяснили, что около 80% населения России испытывают дефицит селена. Ежедневно для нормального функционирования организма человека селена необходимо потреблять: женщинам – 55 мкг; мужчинам – 70 мкг. Развивающимся направлением стало обогащение растений селеном, где микроэлемент в процессе обмена сможет включиться в состав аминокислот, образуя селенометионин, селеноцистеин [1, 2]. Однако необходимо вести поиск растений, способных аккумулировать микроэлемент селен в процессе произрастания.

Цель: определить содержание селена в разных частях семени фасоли флуориметрическим методом.

В ходе эксперимента использовали семена фасоли непроросшие и 3-суточные проросшие семена. Содержание селена определено в 2 пробах проросшей и 6 пробах непроросшей фасоли. Основную трудность при определении селена в органическом веществе представляет минерализация проб, что связано с летучестью этого элемента. Минерализацию проводили 24 часа (1 г продукта заливали 5 мл HNO_3 конц.) Далее в пробирку с полученным раствором добавляли 3 мл перхлората ($HClO_4$) и нагревали. На первом этапе выделялись бурые пары азотной кислоты и, после полного её удаления, на дне пробирки образовывался тяжелый белый дым – пары перхлората. После полного разложения образца и появления белого дыма $HClO_4$ раствор становился бесцветным. Его охлаждали, добавляли 2-3 мл воды и снова нагревали до появления дыма $HClO_4$. Для полного перевода селена в 4-х валентное (реакционноспособное) состояние использовали 10% HCl, после чего выдерживали на кипящей водяной бане 10 минут. Далее добавляли 15 мл воды и выдерживали при слабом нагревании до образования конденсата на горлышке колбы. Устанавливали pH =1,5. Добавляли 2 мл 2%-ного раствора комплесона III (Трилон В), 5 мл 0,1%-ного раствора 2,3-диаминонафталина в 0,1H HCl и нагревали 5 минут на кипящей водяной бане. После охлаждения переводили раствор в делительную воронку, добавляли 5 мл перегнанного гексана и экстрагировали «окрашенный» образец в течение 1 минуты. После окончания экстрагирования серии образцов (8 проб) измеряли флуоресценцию растворов на приборе ФАС-2. Флуоресценцию пиазоселенола возбуждали облучением раствора ртутной лампы с применением светофильтров (λ=366 нм). Измеряем интенсивность флуоресценции с помощью вторичного фильтра (λ=520 нм), используя в качестве кювет специальные пробирки с плоским дном, прилагаемые к прибору. Концентрацию селена определяли про градуировочному графику. Исследования

проведены в лаборатории биофизики Института Физики Азербайджанской академии наук.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание селена в семенах фасоли (мкг/г сухой массы)

Варианты	Se (мкг/г)
Непроращенные семена фасоли	0,059
Проращенные семена фасоли	0,03
Семенная кожура непроращенной фасоли	0,005
Семенная кожура проращенных семян фасоли	Ниже порога обнаружения
Семядоли проращенных семян фасоли	0,06

Из таблицы видно, что селен, содержится в большей степени в семядолях фасоли, что объяснимо высоким содержанием в семенах фасоли белка, а этот микроэлемент, как известно, включается в состав аминокислот. Семенная оболочка же содержит более 80 % некрахмальных полисахаридов (целлюлозы, гемицеллюлозы и пектиновых веществ) – пищевых волокон.

Таким образом, установлено, что селен аккумулируется в большей степени в семядолях фасоли, чем в семенной оболочке, при этом его концентрация выше в непроращенных семенах фасоли. Фасоль – продукт, приравниваемый по количеству легкоусвояемых белков к мясу, может являться дополнительным источником микроэлемента селена.

Выражаем благодарность за помощь в проведении исследований проф. Гусейнову Т.М. (д.б.н.).

Список литературы

1. Аникина, Л.В. Селен. Экология. Патология. – Чита: ГМА, 2002. – С. 11 – 54.
2. Голубкина Н.А. Перспективы использования селена в растениеводстве // Вестник российской академии сельскохозяйственных наук. – 2006. - № 1. – С. 49-50.

УДК573.6:577.21

АНАЛИЗ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВВ ПОПУЛЯЦИЯХ МУЖЧИН МИНСКА И НОВОСИБИРСКА

Перепечай Я.И., Татару Д.А.
научный руководитель канд. биол. наук Маркова Е.В.
Сибирский федеральный университет,Красноярский центр репродуктивной медицины

По оценкам ВОЗ бесплодием страдает около 15% супружеских пар, при этом в 45-50% случаев оно связано с количественными или качественными нарушениями сперматогенеза. Оценка состояния сперматогенеза имеет важное диагностическое значение при различных формах нарушения репродуктивной функции. Традиционный спермиологический анализ является начальным звеном в цепи лабораторных исследований и позволяет судить о количестве сперматозоидов, их подвижности, жизнеспособности и морфологии. Нормальное протекание сперматогенеза требует скоординированного влияния многочисленных факторов (генетических, клеточных, гормональных и др.). Следствием нарушения процесса созревания может быть наличие анеуплоидии в ядрах сперматозоидов, а также фрагментация ДНК сперматозоидов.

Фрагментация ДНК в сперматозоидах играет важную роль в нарушении функционирования генома мужских гамет. Повреждение ДНК в мужских гаметах выступает как фактор риска для ряда неблагоприятных клинических исходов, таких как нарушение развития эмбриона на преимплантационной стадии, невынашивание беременности, увеличение риска генетических заболеваний у потомства.

В последнее время фрагментация ДНК сперматозоидов рассматривается, как один из важных факторов в нарушении репродуктивной функции человека, поэтому изучение данной проблемы актуально для современной репродуктивной медицины. Также большой интерес представляют популяционные исследованиефрагментации ДНК сперматозоидов, с целью выявления еевклада в потенциальную фертильность мужчин, проживающих на той или иной территории. Для Минска и Новосибирска подобных исследований ранее не проводилось.

Целью работы было:

1.Исследовать фрагментацию ДНК в сперматозоидах мужчин из г. Новосибирска и г. Минска методом SCSA(spermchromatinstructureassay) с использованием проточного цитометра.

2.Провести анализ корреляции между уровнем фрагментации ДНК в сперматозоидах и основными показателями спермограммы.

3.Оценить уровень фрагментации ДНК сперматозоидов в зависимости от эколого-климатических условий проживания.

4.Сравнить полученные данные с имеющимися в литературе для мужчин с бесплодием.

Набор клинического материала проводился на базе Института цитологии и генетики СО РАН г. Новосибирска. Объектом исследования был эякулят 241 мужчины города Минска (22,6±3,62 года), а также 152 мужчин Новосибирска (23±4,0 года)Мужчины не имели детей и не знали свой репродуктивный статус, проживали в исследуемом городе не менее 5 лет.

Исследование фрагментации ДНК в сперматозоидах эякулята проводилось методом SCSA. Метод основан на способности акридинового оранжевого флюоресцировать при связи с двухцепочечной молекулой ДНК зеленым, а с

одноцепочечными молекулами ДНК – красным.Анализ количества сперматозоидов с красной и зеленой флюоресценцией осуществлялся на флюоресцентномцитометреGuavaEasyCyte («GuavaMillipore», США). Подсчитывали 5000 клеток в каждом образце. Каждый образец оценивался в трех повторностях.

За норму принимались показатели ИФД ≤15%, к пограничным значениям относили ИФД >15%, но <27% и к высокому количеству сперматозоидов с фрагментированной ДНК относили образцы с ИФД ≥27[1].

При статистической обработке результатов использовали программу Statistica 7.0. Рассчитывали средние значения, медиану, применяли корреляционный метод Спирмена, критерий χ2 и Т-критерий для независимых выборок.

Среди 241 обследованных мужчин города Минска, высокий ИФД обнаружен у 4 человек, что составило 1,7% от всего количества обследованных. Нормальный ИФДимели 216 человек (89,6%), пограничные значения имел ИФД 21 мужчины, что составляет 8,7%.В исследованной популяции мужчин Новосибирска высокий ИФД был обнаружен у 4 человек (2,63%), нормальный ИФД имели 136 мужчин (89,47%),в зоне промежуточных значений был ИФД 12 мужчин, что составляет 7,89% (рис.1).

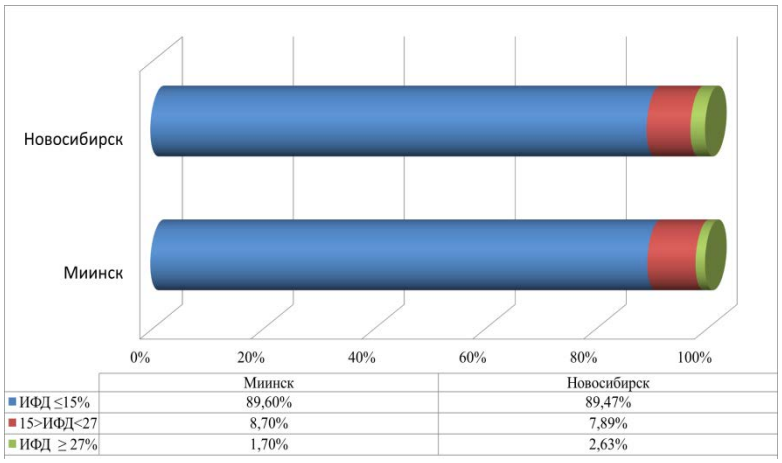


Рисунок 1.распределение значений ИФД в популяцияхмужчин Минска и Новосибирска

Средний показатель ИФД у исследованных мужчин Минска составил 9,16±0,39, для мужчин Новосибирска этот показатель был равен 8,23±0,53. Согласно Т-критерию Стьюдента средние значения в двух выборках не различаются (P=0,44).

В таблице 1 представленны показатели ИФД, из литературных данных, а также результат полученный в нашем исследовании.

Таблица 1. Показатели ИФД

Исследование		N			
Авторы	Группа исследуемых		ИФД ≤15%	15>ИФД<27	ИФД ≥ 27%
Шеина Ю.И. и др. [2]	Пациенты с бесплодием	446	32,9%	41,0%	25,5%
VirroM.R. et al [3]	Пациенты с бесплодием	249	71,5%		28,5%
Larson-Cook K.L. [4]	Пациенты с бесплодием	89	88,8%		11,2%
MicinskiP. [5]	Пациенты с	60	65%	35%	

	бесплодием				
Данные нашего исследования	Мужчины с неустановленной фертильностью	393	89,5%	8,29%	2,16%

Как можно видеть данные нашего исследования, полученные для мужчин с неустановленной фертильностью достоверно отличаются от литературных данных, полученных для мужчин с бесплодием ($p<0,001$). Сравнительный анализ данных литературы показывает, что ИФД бесплодных мужчин достоверно не отличаются в исследованиях Шеиной Ю.И., VirroM.R., Larson-CookK.L., исключение составляют результаты, полученные Micinski P.($p<0,001$). Эти результаты позволяют предположить, что ИФД не зависит от регионального распределения мужчин.

Был проведен анализ корреляции между уровнем фрагментации ДНК в сперматозоидах и основными показателями спермограммы исследуемых пациентов. Показатели спермограммы были предоставленны специалистами Института цитологии и генетики СО РАН г. Новосибирска. На рисунке 2 представлены значения медианы таких показателей как концентрация сперматозоидов, процент прогрессивно подвижных форм и процент морфологически нормальных сперматозоидов, а также стандартная ошибка для этих параметров.

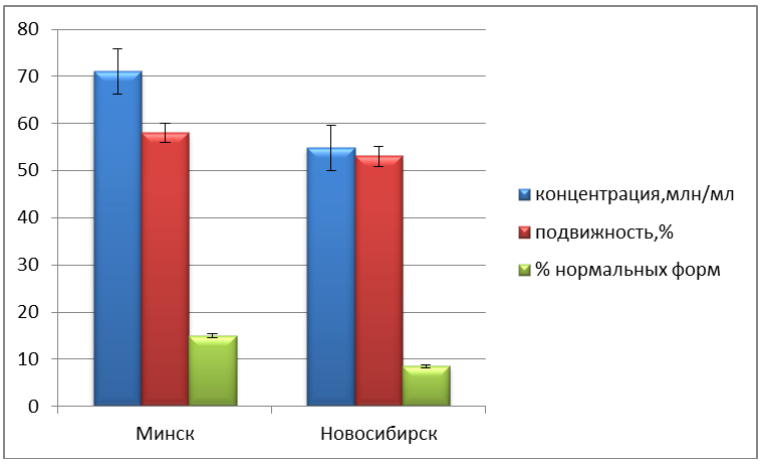


Рисунок 2.значение некоторых показателей спермограммы в популяциях мужчин Минска и Новосибирска

Как Видно на рисунке 2 такие показатели как концентрация сперматозоидов и процентное отношение морфологически нормальных форм для мужчин Минска достоверно выше ($p<0,001$), по сравнению с мужчинами Новосибирска.

Нами был проведен корреляционный анализ приведенных выше показателей спермограммы с индексом фрагментации ДНК. В популяции Новосибирска обнаружена отрицательная корреляция ИФД с концентрацией сперматозоидов ($r=-0,32$; $p<0,05$), количеством прогрессивно подвижных форм ($r=-0,52$; $p<0,005$) и процентом морфологически нормальных сперматозоидов ($r=-0,31$; $p<0,005$). Для популяции Минска корреляционные отношения ИФД были обнаружены с подвижностью ($r=-0,21p<0,005$), и с концентрацией сперматозоидов ($r=-0,13,p<0,005$).

Заключение

Среди обследованных мужчин города Минска, высокий ИФД имели 1,7% мужчин, нормальный ИФДимели 89,6%, ИФД в области пограничных значений

выявлен у 8,7% мужчин. В исследованной популяции мужчин Новосибирска высокий ИФД был обнаружен у 2,63% человек, в зоне промежуточных значений был ИФД 7,89%, нормальный ИФД имели 89,47% мужчин.

В популяции Новосибирска обнаружена отрицательная корреляция ИФД с концентрацией сперматозоидов, количеством прогрессивно подвижных форм и процентом морфологически нормальных сперматозоидов. Для популяции Минска корреляционные отношения ИФД были обнаружены с подвижностью и с концентрацией сперматозоидов. Отмеченные корреляции свидетельствуют о целесообразности определения ИФД у мужчин с нарушениями репродуктивной функции.

Хотя были обнаружены достоверные различия некоторых показателей спермограммы, различий уровня фрагментации ДНК в зависимости от эколого климатических условий проживанияне было найдено. Средний ИФДу исследованных мужчин Минска составил 9,16±0,39, для мужчин Новосибирска этот показатель был равен 8,23±0,53.

Показатели ИФД, полученные в нашем исследовании для мужчин, не знающих свой репродуктивный статус, достоверно отличаются от литературных данных, полученных для мужчин с бесплодием.

Список литературы

1 Larson,K.L, Relationship of assisted reproductive technique(ART) outcomes with sperm chromatin integrity and maturity as measures by the sperm chromatin structure assay (SCSA)/K.L. Larson, C. J.De Jonge, A. M. Barnes // Hum. Reprod. – 2000. –№15.–P.1717-1722.

2Шеина, Ю.И. Анализ фрагментации ДНК в сперматозоидах с помощью окраски акридиновым оранжевым у пациентов с бесплодием/ Ю.И Шеина., Т.А Зайцева, Н.А.Махалова, А.В.Новосельцева, Е.В. Маркова, А.В.Светлаков// Проблемырепродукции. –2012. –№ 5. –С.74-79.

3 Virro, M.R. Spermchromatinstructureassay (SCSA) parametersarerelatedtofertilization, blastocystdevelopment, andongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles/ M.R.Virro, K.L. Larson-Cook, D.P. Evenson // FertilSteril. – 2004. –V. 81, № 5. –P.1289-1295.

4Larson-Cook,K. L. Relationship between the outcomes ofassisted reproductive techniques andsperm DNA fragmentation as measured bythe sperm chromatin structure assay/K. L. Larson-Cook, ,J. D. Brannian,, K. A. Hansen, K.M. Kasperson, E. T. Aamold, D. P. Evenson// FertilSteril. – 2003. –V. 80, № 4. –P.895-902.

5Miciński, P. The sperm chromatin structure assay (SCSA)as prognostic factor in IVF/ICSI program/P. Miciński , K. Pawlicki, E. Wielgus, M. Bochenek, I. Tworkowska //Reproductive biology. –V. 9, №1. – P. 65-70.

УДК 575.224.22

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА MDR1 У НАСЕЛЕНИЯ Г.КРАСНОЯРСКА

Покровский А.А. Котловский М.Ю. Оседко А.В., Оседко О.Я. Котловская О.С., Якименко А.В., Курдояк Е.В.
Научный руководитель д-р мед. наук Котловский Ю.В.
Научный руководитель канд. биол. наук Титова Н.М.
ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии
ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Центральная научно-исследовательская лаборатория

Ген MDR1 кодирует гликозилированный мембранный белок первоначально обнаруженный в клетках, которые развили устойчивость к средствам химиотерапии. Белок, как правило, называют Р-гликопротеин или белок множественной лекарственной устойчивости 1. Это АТР-зависимый переносчик, который участвует в выведении из клетки лекарственных средств и ксенобиотиков [1]. Ген MDR1 экпрессируется во многих органах включая почки, печень, желудочно-кишечный тракт, и головной мозг. Ряд полиморфных маркеров в гене MDR1 ассоциирован с уровнем его экспрессии, а также со способностью к выведению лекарственных средств из клетки. В настоящее время в гене MDR1 изучено много полиморфизмов, но предпочтения по исследованию ассоциаций отдаются трем из них (c.1236C>T, c.2677G>T/A и c. 3435C>T).

Исследование полиморфных маркеров гена MDR1 представляется актуальным, поскольку позволит изучить распространенность мутантных аллелей у жителей города Красноярска. В дальнейшем исследования будут направлены на изучение влияния генетических полиморфизмов MDR1 на уровень лекарственных средств, которые являются субстратами Р-гликопротеина.

Таким образом, целью данной работы явилось изучение частот полиморфизмов c.1236C>T, c.2677G>T/A и c. 3435C>T гена MDR1.

В исследовании приняли участие 324 человека (172 женщины, 152 мужчины), жители города Красноярска. Средний возраст женщин составлял 55,63±9,59 , мужчин – 53,7±8,95 лет. В качестве клинического материала использовался образец ДНК, выделенный из венозной крови пациента. Кровь забиралась в стерильные пластиковые пробирки с добавлением антикоагулянта – EDTA. Для выделения геномной ДНК был использован стандартный фенол-хлороформный метод. Для проведения последующих этапов молекулярно-генетических исследований использовался специальный набор для идентификации одноточечных нуклеотидных полиморфизмов (ООО НПФ «ЛИТЕХ», ТУ 9398-902-17253567). Согласно инструкции последовательно проводили реакции амплификации, дефосфорилирования и минисеквенирования для дальнейшей идентификации полиморфизмов на времяпролетном MALDI-TOF масс-спектрометре.

Нами было проанализировано три полиморфных маркера в гене MDR1, которые располагаются в области экзонов. Соответствие частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга у общей группы, которая включала контрольную группу и группу пациентов больных ИБС, оценивали по критерию хи-квадрат с помощью онлайн калькулятора (http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml). Частоты генотипов при $\chi 2 < 3.84$ соответствуют равновесию Харди-Вайнберга.

Как показывают результаты генетического анализа общей группы (N=324), по всем выбранным полиморфизмам были обнаружены нормальные и мутантные гомозиготы, а также гетерозиготы. Для полиморфизма с.1236C>T гена MDR1 распределение частот генотипов было следующим: нормальная гомозигота (НГ) встречалась в 28,7%, гетерозигота (ГЗ) в 49,4% и мутантная гомозигота (МГ) в 21,9% случаев. По распределению Харди-Вайнберга ожидаемые частоты будут следующими: НГ – 28,5%, ГЗ – 49,8% и МГ – 21,7%. Значение хи-квадрата равно 0,02, что говорит о высокой степени соответствия полученных данных распределению Харди-Вайнберга. Полученные данные также соответствуют распределению частот в других популяциях [2,3,4,5]. Частоты аллелей, генотипы, гетерозиготность и уровень значимости полиморфизма с.1236C>T представлены в таблице 1.

Таблица 1. Соответствие частот аллелей полиморфизма с.1236C>T гена MDR1 равновесию Харди-Вайнберга.

Полиморфизм MDR1 с.1236C>T (rs1128503)				Наблюдаемые		Ожидаемые по Харди-Вайнбергу		
Генотип	N*	Аллель C	Аллель T	Частота	%	Частота	%	P*
CC	93	186	0	93	28,7	92,8	28,5	
CT	160	160	160	160	49,4	161,3	49,8	
TT	71	0	142	71	21,9	70,4	21,7	
Всего	324	346	302	324	100,0	324,0	100,0	0,8888
Частота аллеля		0,53	0,47					

*Примечание: N – количество человек, P – уровень значимости (уровень соответствия равновесию Харди-Вайнберга).

Для полиморфизма с. 3435C>T гена MDR1 распределение частот генотипов было следующим: НГ встречалась в 20,1%, ГЗ в 51,9% и МГ в 28% случаев. По распределению Харди-Вайнберга ожидаемые частоты будут следующими: НГ – 21,1%, ГЗ – 49,7% и МГ – 29,2% (табл. 2). Значение хи-квадрата равно 0,62. Полученные данные соответствуют критерию Харди-Вайнберга. Частота аллелей также коррелирует с литературными данными [2,3,4,5].

Таблица 2. Соответствие частот аллелей полиморфизма с. 3435C>T гена MDR1 равновесию Харди-Вайнберга.

Полиморфизм MDR1 с. 3435C>T (rs1045642)				Наблюдаемые		Ожидаемые по Харди-Вайнбергу		
Генотип	N	Аллель C	Аллель T	Частота	%	Частота	%	P
CC	65	130	0	65	20,1	68,5	21,1	
CT	168	168	168	168	51,9	161,0	49,7	
TT	91	0	182	91	28,0	94,5	29,2	
Всего	324	298	350	324	100,0	324,0	100,00	0,4309
Частота аллеля		0,46	0,54					

Соотношение частот аллелей полиморфизма c.2677G>T/A гена MDR1 было следующим: НГ встречалась в 23,4%, ГЗ в 63,6% и МГ в 13% случаев. По распределению Харди-Вайнберга ожидаемые частоты будут следующими: НГ – 30,5%, ГЗ – 49,5% и МГ – 20% (табл. 3). Значение хи-квадрата равно 26,46. Таким образом, гипотезу о соответствии наблюдаемого распределения критерию Харди-Вайнберга можно отвергнуть. Высокий уровень гетерозигот в нашей популяции вероятно связан с особенностями распределения аллелей в данном регионе, либо же это особенности конкретной выборки. Общее соотношение частот аллелей соответствует данным, которые получили другие авторы [2,3,4,5].

Таблица 3. Соответствие частот аллелей полиморфизма c.2677G>T/A гена MDR1 равновесию Харди-Вайнберга.

Полиморфизм MDR1 c.2677G>T/A (rs2032582)				Наблюдаемые		Ожидаемые по Харди-Вайнбергу		
Генотип	N	Аллель G	Аллель T	Частота	%	Частота	%	P
GG GT TT	76 206 42	152 206 0	0 206 84	76 206 42	23,4 63,6 13,0	98,9 160,2 64,9	30,5 49,5 20,0	
Всего	324	358	290	324	100,0	324,00	100,00	0,0000
Частота аллеля		0,55	0,45					

Таким образом, полиморфизмы гена MDR1 имеют высокий процент распространенности у жителей города Красноярска. Полученные данные будут использоваться нами в дальнейшей работе по изучению индивидуальной фармакокинетики различных лекарственных препаратов. Другие авторы могут использовать их в популяционно-генетических исследованиях.

Список использованных источников

1.Martin F, Fromm ME. The pharmacogenomics of human P-glycoprotein. In: Licinio J, Wong ML, eds. Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies. Weinheim, Germany: Wiley VCH; 2003:159-178.

2.Пельс Я. Р. Полиморфизм гена MDR1 человека в популяциях Сибири и Средней Азии/ Я.Е. Пельс, А.В. Марусин //Молекулярная биология. - 2007 –Т.41, №6. – С.982-988.

3.Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. // Clin. Pharmacol. Ther. 200. V. 69. №3. P. 169-174.

4.Marzolini C, Paus E, Buclin T, et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. // Clin. Pharmacol. Ther. 2004. V. 75. P. 13.

5.Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Maasz A, Takacs I, Beres J, Fodor L, Szabo M, Melegh B. Genetic variability and haplotype profile of MDR1 (ABCB1) in Roma and Hungarian population samples with a review of the literature. // Drug. Metab. Pharmacokinet. 2011. V. 26. №2. P. 206-215.

УДК 616-092.4

ИСЛЕДОВАНИ КИСЛОТНОЙРЕЗИСТЕНТНОСТИЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

Самойлова А.А., Диденко В. М,
научный руководитель канд. биол. наукГершкорон Ф.А.
Сибирский Федеральный Университет

Рак почки – это такое злокачественное опухолевое образование, которое развивается в одной или в обеих почках, преимущественным образом произрастает на основе эпителиального слоя (поверхностного слоя) поражаемого органа и склонно к метастазированию. Рак почки, симптомы которого чаще всего отмечаются у мужчин в возрасте 55-75 лет, также диагностируется у женщин, причем в период рассмотрения статистики последних лет наблюдается рост заболеваемости по жителям развитых стран.

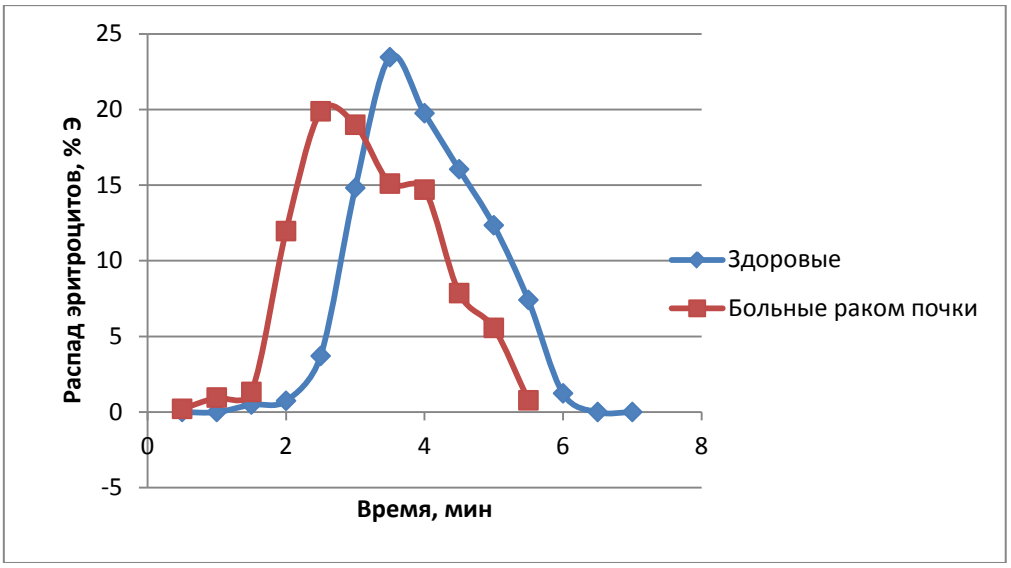
Рак почки в плане процессов, актуальных для него, заключается в появлении в почке бесконтрольно делящихся опухолевых злокачественных клеток, за счет чего на их основе образуется опухоль.
Диагностика рака почки стала успешнее с появлением современных неинвазивных диагностических методов, таких как ультразвуковая (УЗКТ) и рентгеновская компьютерная томография (РКТ), магнитно-резонансная томография (МРТ).

Почки участвуют в эритропоэзе. Эритропоэз стимулируется уменьшением доставки кислорода к тканям, которое детектируется почками. Почки в ответ на тканевую гипоксию или ишемию выделяют гормон эритропоэтин, который стимулирует эритропоэз. Этот гормон стимулирует пролиферацию и дифференциацию клеток-предшественников красного кровяного ростка, приводя тем самым к ускоренному эритропоэзу в кроветворных тканях и к увеличению выхода эритроцитов в кровь. Исследуя кислотную резистентность эритроцитов, можно судить о состоянии почек. Определение кислотной резистентности эритроцитов позволяет точно определить устойчивость к гемолизу и возрастной состав красных клеток крови.

Для распределение эритроцитов по стойкости к различным гемолитикам используется метод кислотных эритрограмм. Для измерения кинетики гемолиза используется установка, состоящая из фотоэлектрического колориметра и водяного термостата.Гемолитик - соляная кислота. Анализ проводится при температуре 24 градуса по Цельсию. Результатом опыта является ряд значений оптической плотности, убывающей во времени в соответствии с ходом гемолиза.

Основным фактором, определяющим стойкость эритроцита, является его возраст. При этом наиболее молодые, выходящие из костного мозга, эритроциты обладают наибольшей стойкостью и занимают на эритрограмме крайнее правое положение. Циркулируя в русле, эритроциты созревают и в дальнейшем стареют. Эти процессы сопровождаются постепенным снижением стойкости, что на эритрограмме отражается смещением влево. При нормальном состоянии взрослого организма эритрограмма строго стабильна и отражает динамическое равновесие в системе крови.

В ходе выполненной работы были получены и исследованы эритрограммы больных раком почки и здоровых людей. В результате были получены следующие данные:



Для крови здорового пациента характерно начало гемолиза на 2 минуте, резкий максимум наблюдается на 3.5 минуте, сама длительность гемолиза составляет 6 минуты. С начала отсчета и до 2 минуты наблюдаются сферуляционные изменения эритроцитов.

Для крови больных раком почки характерно начало гемолиза на 1.5 минуте, резкий максимум наблюдается на 2.5 минуте, длительность гемолиза составляет 5.5 минут. Эритрограмма больных раком почки сдвинута влево, связанно это с преобладанием старых эритроцитов в системе крови. Объясняется это тем, что при патологии почки нарушается синтез эритропоэтина, стимулирующего образование новых эритроцитов.

УДК 57.017.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ДВУМЕРНЫХ КОМПОЗИТНЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКССИБУТИРАТА И ГИДРОКСИАПАТИТА

Свешников А.Н., Шумилова А.А.
научный руководитель д. б. н. Волова Т. Г.
Сибирский Федеральный университет

Современная биотехнология позволяет получать широкий спектр целевых продуктов различной природы, включая новые экологически чистые биоматериалы с высокими потребительскими свойствами. Наиболее актуальной областью применения биоматериалов является биомедицина, остро нуждающаяся в биосовместимых материалах для изготовления медицинского инструментария, систем депонирования и доставки лекарственных средств, эндопротезов, сорбентов, биоконструкторов органов и тканей [4]. Открытие полигидроксиалканоатов (ПГА) - полимеров микробиологического происхождения, явилось значимым событием для биотехнологии новых материалов. ПГА - это линейные, термопластичные, биоразрушаемые и биосовместимые полимеры, сферы применения которых потенциально широки, включая восстановительную медицину, фармакологию, сельское и коммунальное хозяйство, радиоэлектронику и др [1].

Сочетание имплантационных матриксов на примере ПГА с биологически активным керамическими композитами, как ожидается, придадут имплантанту прочность и повысят остеокондуктивность [4]. На уровне ультраструктуры кости и кальцинированных тканей подходящими анизотропными нанокомпозитами являются соединения фосфата кальция, встроенные в матрицы основного полимера. Среди соединений фосфата кальция наибольшее сходство с минеральным составом кости имеет гидроксиапатит [2].

Установлено, что ПГА, усиленные частицами ГАП, имеют преимущества перед чистыми полимерами в качестве заменителя костной ткани, так как добавление гидроксиапатита улучшает остеоинтегративные свойства полимера и улучшает взаимодействие с тканями [4]. Физико-механические характеристики данных композитов близки костным тканям конечностей и могут быть использованы для изготовления сложных костных протезов, включая моделирование губчато-кортикальных конструкций. Гибридные конструкции из ПГА с гидроксиапатитом, дополнительно нагруженные лекарственными препаратами, имеют перспективы для лечения длительно текущих костных инфекций, например, хронических остеомиелитов и так называемых имплантат ассоциированных остеомиелитов [2].

Исходя из выше сказанного, целью данного исследования является изучение свойств композитных 2D-матриксов на основе П3ГБ с разным процентным включением гидроксиапатита.

Материалы и методы исследования.

Для получения композитных 2D-матриксов использовали гомогенизированный порошок чистого поли-3-гидроксибутирата (П3ГБ), синтезированного в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН. Приготовленный 2% раствор полимера (20 мл) смешивали с разным количеством ГАП производства Sigma-Aldrich с диаметром частиц 200 нм: 5, 10, 15 и 20 % по массе.

Каждый образец нагревали на водяной бане до 50 C^0 и для улучшения диспергирования ГАП обрабатывали ультразвуком в течение 10 минут. Затем полученный раствор выливали на обезжиренную поверхность стеклянных чашек Петри и оставляли в вытяжном шкафу до полного испарения растворителя (1-2 сутки).

Микроструктуру композитных изделий анализировали сканирующей электронной микроскопией с использованием микроскопа JEM-100C с растровой приставкой EM-ASID-4, Япония) и TM-3000 (Hitachi HT Corporation, Япония) при напряжении 5 кВ.

Сопротивление растяжению (модуль Юнга) образцов при деформации измеряли на тестовой системе Instron 5564. Определение характеристик поверхности мерных матриксов проводили на базе измерения контактного угла смачивания: (q, град); вычисляли свободную поверхностную энергию (γS), свободную энергию межфазовой поверхности (γSL) и величину сил сцепления (WSL) (эрг/см^2), используя известные уравнения. Для определения контактных (краевых) углов смачивания водой образцы помещали на предметное стекло и с помощью автоматической микропипетки наносили на поверхность пленки капли дистиллированной воды объемом 100мкл, по 3 каждого объема. С помощью цифровой камеры получали компьютерное изображение капли и определяли величину угла (находили среднее значения величины угла из измерения 3-х капель каждого объема).

Исследования на образование гидроксиапатит содержащих отложений на поверхности пленок проводили в бесклеточном растворе по составу имитирующем плазму крови человека (SBF- тест (Simulated body fluid)) [3]. Образцы выдерживали в течение 21 суток в приготовленной среде с концентрацией ионов близкой по соотношению к плазме крови человека. Анализировали изменение массы образцов в ходе SBF-теста и делали РЕМ-снимки поверхности для наблюдения изменений. Цитотоксичность полученных изделий исследовали в культуре дифференцированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга крыс в клетки остеобластического ряда in vitro. Количество жизнеспособных клеток на композитных пленках подсчитывали с помощью МТТ-теста, который заключается в способности живых клеток превращать растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формазана (МТТ-ф). Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают. Интенсивность превращения МТТ в МТТ-ф отражает общий уровень жизнеспособности клеток на исследуемом матриксе.

Данные МТТ-теста подтверждали измерением активности щелочной фосфатазы (маркера дифференцировки ММСК в остеобласты).

Результаты исследований и обсуждения.

Получена серия пленочных образцов на основе ПЗГБ с разным содержанием ГАП (5%, 10%, 15%, 20%). По данным визуального анализа, отмечена гладкая и матовая поверхность контрольного образца (чистый ПЗГБ), по сравнению с шероховатыми и неоднородными пленками с большим включением ГАП. Отмечено, что прозрачность матриксов закономерно уменьшалась с увеличением содержания ГАП. Композитные матриксы имели средний диаметр 140 мм и толщину 0,056 мм.

По данным РЭМ снимков топография поверхности пленочных образцов на основе ПЗГБ однородна, а на поверхности композитных матриксов отмечено включение апатита в композит по всей поверхности пленок с незначительными агломерациями частиц ГАП. Скопление частиц можно объяснить разницей в размерах и молекулярной массе полимера и наполнителя.

Во всех образцах отмечается зависимость между процентным включением ГАП в полимерном матриксе и средним модулем Юнга: так, с увеличением процентного содержания ГАП сопротивляемость образцов к продольной деформации уменьшается.

Кроме того в ходе исследования установлено, что существует зависимость между процентным содержанием ГАП в пленочных образцах и величиной краевого угла смачивания (КУС). С увеличением содержания ГАП от 0 до 20% показатель КУС

уменьшается, что говорит об увеличении гидрофильности образцов. Если величина краевого угла смачивания поверхности у образца с 5% ГАП составляла порядка 38^{o}, то у пленочного матрикса с включением 20% ГАП этот показатель был гораздо меньше – 20^{o}. Смачивание поверхности биоматериалов жидкостями, то есть их гидрофильность, является одним из косвенных показателей биосовместимости.

Результаты дифференциального термического анализа (ДТА) показали существенное влияние вводимого в композит наполнителя в виде ГАП на температуру плавления и деградации полимера, что подтверждает включение частиц ГАП в структуру пленочного композита.

В ходе эксперимента на биологическую активность пленочных образцов в жидкой среде (SBF) отмечено увеличение массы всех пленок, что можно объяснить формированием апатитового слоя или отложением солей раствора, имитирующего плазму крови. Например, масса образца с 20% содержанием ГАП после инкубации в растворе в течение 21 суток увеличилась с 7,88 мг на 30% (10,25 мг). Полученные данные SBF-теста согласуются с РЭМ, на которых видны многочисленное отложение солей в виде перистых узоров или кристаллов и скоплений неправильной формы. Спектральный анализ образцов показал преобладание в отложениях солей NaCl, что, скорее всего, связано с высокой концентрацией используемого для SBF-теста раствора.

По данным МТТ-теста отмечена наибольшая жизнеспособность дифференцированных ММСК крыс на композитных образцах с 5-10% содержанием ГАП. В первые сутки культивирования на пленке с 5% ГАП и 10% ГАП содержалось порядка 18,5*10^{5} кл-к/мл и 18,3*10^{5} кл-к/мл, соответственно. После 10 дней культивирования на этих же образцах отмечалось самое большое содержание клеток (ПГБ/ГАП5% - порядка 19,5*10^{5} кл-к/мл; ПГБ/ГАП10% - 19,6*10^{5} кл-к/мл). Вероятно, большее процентное включение ГАП в композит приводит к закислению среды.

Данные МТТ-теста согласуются с показателями теста на активность щелочной фосфатазы: зарегистрировано увеличение количества фермента в клетках культивируемых на образцых с 5-10% содержанием ГАП.

Проведенные эксперименты показали, что включение ГАП в П3ГБ существенно влияет на физико-механические свойства полимера в зависимости от соотношения компонентов. Полученные композитные изделия обладают выраженной биологической активностью in vitro и высокой адгезией культивируемых остеобластов дифференцированных из ММСК крыс с 5-10% содержанием ГАП.

Список литературы

1. Волова, Т.Г. Полигидроксиалканоаты (ПГА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая – Новосибирск.: СО РАН, 2003. – 260 с.;

2. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии, учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009;

3. T. Kokubo, H. Takadama, Biomaterials 27 (2006) 2907–2915;

4. Mehdi Sadat-Shojai, Shiva Irani etc. Mohammad-Taghi Khorasani, Ahmad Jamshidi, Shiva Iranino-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: A comprehensive study on the structural and in vitro biological properties / Materials Science and Engineering C, 2013.

УДК 577.114.4, 543.554

АМФОТЕРНОСТЬ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

Слатинская О.В.
научный руководитель д-р физ.-мат. наук Слюсарева Е.А.
Сибирский федеральный университет

Введение

Адресная доставка лекарства к больному органу и его высвобождение в пораженной области является важной задачей лекарственной медицины. Чтобы лекарство было наиболее эффективным нужно, чтобы его молекулы достигли поражённые клетки органа-мишени. Подавляющее большинство лекарств ослабляет свои качества по пути к поражённому органу, так как действует не избирательно, а на организм в целом. Одним из распространённых способов выйти из данной ситуации является увеличение дозы лекарства, что является достаточно опасным и неэффективным методом, так как многие лекарства токсичны, и увеличение дозы может вызвать у пациента тяжелые последствия. Это особенно важно для противораковых препаратов, которые убивают не только больные, но и здоровые клетки.

Для решения данной проблемы учёные ищут пути создания «транспортного средства» для адресной доставки лекарственного препарата в клетки органа-мишени. «Транспортное средство» должно удерживать внутри себя лекарственный препарат и высвобождать его при помощи внешнего управляющего сигнала (напр. изменения pH), а для достижения лучшего транспортного эффекта его размер должен быть минимизирован до нано- и/или микро частиц. Как правило, для этого используются биологически активные, биосовместимые, нетоксичные полимеры, обладающие способностью связываться с лекарственными препаратами. Всеми перечисленными качествами обладает хитозан, продукт дезацетилирования хитина, который, благодаря наличию аминогрупп в слабокислой среде, имеет катионную природу, он экологичен и легко возобновляем.

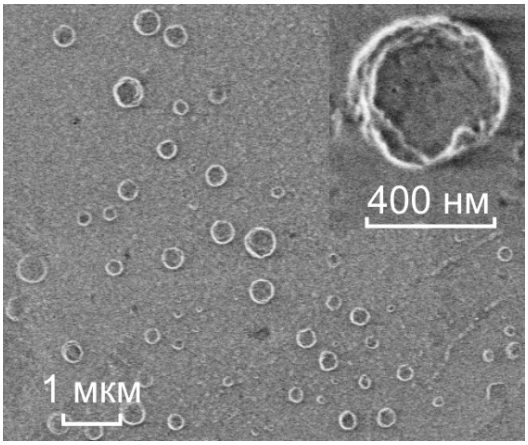


Рис. 1. ПЭК на основе хитозана и хондроитин сульфата (pH 5,6)

На кафедре «Фотоника и лазерные технологии» СФУ синтезируются и исследуются свойства полиэлектролитных комплексов (ПЭК) на основе природных полимеров – поликатионного хитозана и полианионного хондроитин сульфата для их потенциального применения в качестве системы доставки лекарственных средств, рис 1. [1]. Искусственно синтезированные комплексы содержат основные и кислые группы и, предположительно, обладают амфотерными свойствами.

Целью настоящей работы является выявление амфотерных свойств синтезированных полиэлектролитных комплексов. Для этого были решены следующие задачи: синтез полиэлектролитных комплексов, исследование зависимости pH растворов ПЭК от pH растворителя, сравнение полученных зависимостей с аналогичными для растворов поликатиона (хитозана), полианиона (хондроитин сульфата),

натурального амфолита бычий сывороточный альбумин (БСА). БСА представляет собой глобулу в форме сплюснутого эллипсоида вращения, таким образом, он схож по своей структуре с исследуемым ПЭК. Так же, БСА является кислым амфотерным полиэлектролитом, т.е. сочетает в себе кислые и основные свойства, являясь белковой буферной системой - одной из сильнейших в организме благодаря наличию заряда и гидратной оболочки.

Материалы и методы

В работе были использованы: хитозан низковязкий (Sigma), хондроитин сульфат, лиофилизированный порошок из трахеи быка (Sigma), бычий сывороточный альбумин (Sigma), дистиллированная вода, ацетатный буфер (pH 5,6), водные безбуферные растворы в диапазоне pH от 3,6 до 5,6 (получались добавлением ледяной уксусной кислоты), фосфатный буфер (pH 6,8).

Для синтеза ПЭК использовались весы, магнитная мешалка, ультразвуковая мешалка, набор микропипеток, центрифуга. Для измерения pH использовался pH-метр SevenCompact S220 (Mettler Toledo).

Результаты и обсуждения

Формирование полиэлектролитных комплексов осуществлялось благодаря электростатическому взаимодействию противоположно заряженных функциональных амино- и сульфогрупп хитозана и хондроитинсульфата, соответственно. Это происходило при смешивании буферного раствора хитозана (pH 5.6) и водного раствора хондроитинсульфата при тщательном подборе их соотношения в смеси (а именно, хитозан к хондроитин сульфату в соотношениях 2:1, 2,2:1 и 1,8:1), порядка добавления, скорости перемешивания [1]. Для удаления молекулярной полимерной фракции производилось центрифугирование растворов с последующим выделением осадка (ПЭК). Ресуспензирование растворов производилось в безбуферных водных растворах.

Для минимизации погрешности, связанной с взвешиванием сухого порошка хитозана, хондроитин сульфата, БСА, изначально готовились концентрированные 1% растворы этих веществ, к которым затем добавлялись безбуферные ацетатные растворы.

Затем, было проведено определение pH полученных растворов с помощью pH метра. Полученные результаты графически представлены на рис.2., где по оси абсцисс отложен pH ацетатных растворов, по оси ординат – полученное значение pH после добавления к ацетатному раствору исследуемых веществ. Из рисунка 2. видно, что ПЭКи проявляют амфотерные свойства, но эти зависимости различны для различных соотношений поликатиона к полианиону. Наиболее пологая кривая соответствует соотношению 2:1, что и является оптимальным соотношением для данного полиэлектролитного комплекса. Для образцов с соотношение поликатиона к полианиону 2,2:1 и 1,8:1 амфолитные свойства проявляются на более узком диапазоне pH (от pH 5,0 до 5,8)

На рис.3. представлены аналогичные результаты для ПЭК (соотношение катиона к аниону 2:1), БСА, хитозана, хондроитин сульфата.

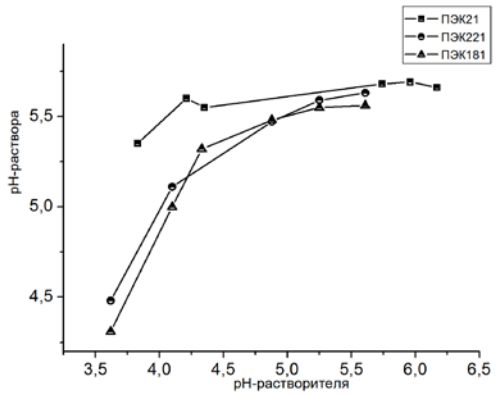


Рис.2. Изменение pH при добавлении исследуемых ПЭК в ацетатный раствор

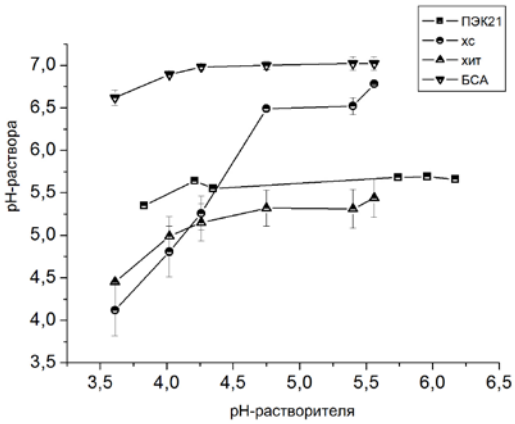
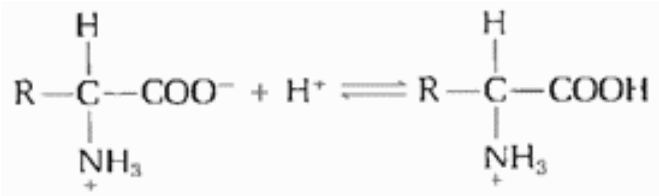


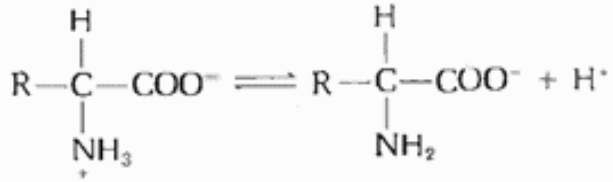
Рис 3. Изменение pH при добавлении ПЭК, хондроитин сульфата, хитозана и БСА в ацетатный раствор

Из рис. 3, следует, что ПЭК и БСА проявляют буферные свойства, в отличие от хондроитин сульфата и хитозана (в меньшей степени).

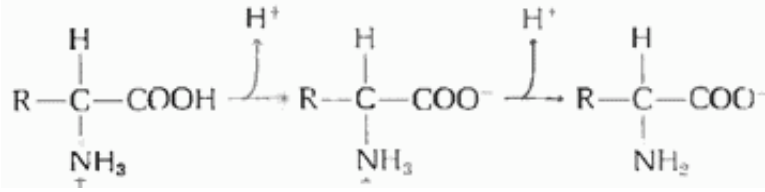
Известно, что аминокислоты могут вести себя как кислоты и как основания. В водном растворе аминокислоты, существуют в форме биполярных ионов, которые функционируют либо как кислоты (доноры протонов):



либо как основания (акцепторы протонов):



Вещества с такими двойственными свойствами являются амфотерными (от греч. «amphi» - оба) и часто называются амфолитами, (сокращение от слов «амфотерные электролиты»). Амфолиты предполагают в своей структуре присутсвие кислотных и основных групп, которые существуют в виде цвиттерионов при определённых значениях pH (изоэлектрическая точка молекулы). Благодаря способности к выборочной ионизации, амфолиты противодействуют изменению pH при добавлении кислоты или основания к исходному веществу. Выступая в роли буфера, в присутствии кислот они принимают на себя протоны из раствора, противодействуя повышению его кислотности. При добавлении оснований амфолиты высвобождают ионы водорода в раствор, тем самым препятствуя возрастанию pH, и сохраняя равновесие системы [2].



Последнее уравнение объясняет, почему хитозан или БСА, попадая в среду отличающуюся по показателю pH от исходной, возвращает значение pH в сторону его исходного значения. В некоторых случаях, значение исходного pH не удаётся достичь из-за недостатка протонов в амфолите. Этот процесс наблюдается при добавлении ПЭК, хитозана и БСА в растворы со значением pH 3,5-4,5.

В работе [3] делается предположение, что ПЭК, являясь комплексом из аминополисахарида и остатка аминокислоты может менять свою конформацию, тем самым меняя pH среды.

Выводы

В ходе проведённого эксперимента установлено, что полиэлектролитные комплексы на основе хитозана и хондроитин сульфата обладают амфолитными свойствами. Наиболее ярко это видно в полиэлектролитном комплексе, образованном соотношением хитозана к хондроитин сульфату 2:1. При этом раствор выступает в роли буфера с pH=5,6 (в диапазоне pH растворителя от 3,6 до 6,2). Аналогичными свойствами обладает БСА (pH=7,00, в диапазоне pH растворителя от 3,6 до 5,6).

Полученные результаты необходимо учитывать при создании комплексов ПЭК-лекарственное вещество, в котором при помощи pH можно регулировать степень высвобождения лекарственного вещества из ПЭКа.

Список литературы

1. E. Slyusareva, M. Gerasimova, A. Plotnikov, A.Sizykh «Spectral study of fluorescence dyes adsorption on chitosan-based polyelectrolyte complexes» // Journal of Colloid and Interface Science 2014. V.417. – P. 80-87.

2. Ленинджер А. Основы биохимии в 3-х т. Т. 1. Пер с англ.-М.: Мир, 1985.-367 с., ил.

3. Yangchao Luo, Qin Wang «Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery »// International Journal of Biological Macromolecules 2014.V. 64. – P. 353-367.

УДК 57.085.23

ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПГА РАЗНОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА НА РОСТ И АДГЕЗИЮ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК

Стаценко М.В., Шумилова А.А.,
научный руководитель канд. биол. наук Николаева Е.Д.
Сибирский федеральный университет

Введение. Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластичные линейные полиэфиры микробиологического происхождения, способные разрушаться как в естественных (водоем, почва) так и в лабораторных условиях до нетоксичных продуктов.Благодаря такому свойству как биосовместимость способны служить материалом не только для различных упаковок, но и для медицинского применения. Как известно в процессе ферментации меняя условия культивирования можно изменить и состав полимера, а значит и его свойства (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада), которые могут повлиять на рост и адгезию клеток при культивировании.

Цель исследования: исследовать влияния матриксов на основе ПГА разного химического состава на рост и адгезию культивируемых клеток.

Методы и материалы. В работе использовали образцы высокоочищенных ПГА различного химического состав: гомополимер поли-3-полигидроксибутират (П3ГБ), и сополимеры поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксивалерата (П3ГБ/3ГВ) с включением 3ГВ 12,8 и 22,8%, поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксигексаноата (П3ГБ/3ГГ) с включением 3ГГ 13,6 %, поли-3-гидроксибутирата и поли-4-гидроксибутирата (П3ГБ/4ГБ) с включением 4ГБ 9,5 и 23,1%.

Пленки получены методом полива 2% раствора полимера в хлороформе на обезжиренную поверхность чашек Петри. Высушивали пленки в беспылевом боксе-ламинаре (Labconco, США) при комнатной температуре в течение нескольких суток.С использованием специальной формы нарезали диски диаметром 10 мм. Стерилизацию пленок проводили H_2O_2-плазмой в стерилизаторе Sterrad NX (Johnson&Johnson, США). Топографию поверхности пленок исследовали растровый микроскоп HITACHI TM-3000 с системой микроанализа BRUKER XFlash 430 H (Япония). Свойства поверхности образцов рассчитывали с помощью прибора для измерения краевых углов DSA-25E (Krüss, Германия), с использованием программного обеспечения DSA-4 для Windows. Физико-механические исследования на прочность и деформацию проводили с помощьюуниверсальной электромеханической испытательной машине Инстрон 5565 (Великобритания).

Адгезивные свойства пленок разного химического состава исследовали в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК-КМ), полученных из бедренных костей крыс линии Wistar, выведенных передозировкой эфирным наркозом. Клетки, дифференцированные на остеогенной среде, после 2 пассажей рассеивали на матриксы в количестве $3*10^4$ Кл/мл на пленку. Культивирование проводили в течение 14 суток с заменой среды на каждый третий день.

В первые трое суток культивирования оценивали способность клеток к апоптозу с использованием набора «Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit» (Sigma). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста на 3-и, 7-е и 14-е сутки. Измерение оптической плотности проводилось при длине волны 540 нм на

микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc.). Количество живых, метаболически активных клеток оценивали по калибровочному графику.

Для подтверждения дифференцировки ММСК-КМ в остеобласты использовали следующие показатели: активность щелочной фосфатазы и окрашивания по Von Kossa. Активность щелочной фосфатазы культивируемых клеток регистрировали с использованием набора «Alkaline Phosphatase Detection Kit» (Sigma) на 3-и, 7-е и 14-е сутки. Измерение интенсивности флуоресценции на мультимодальном микропланшетном люменометре Mithras LB 940 (BERTHOLD TECHNOLOGIES, Германия) при λex 360 нм и λem 440 нм. Активность ЩФ оценивали по заранее приготовленному калибровочному графику. Окрашивания по von Kossa проводили для определения отложения кальция по протоколу «Von Kossa Stain for calcium» с использованиям реагентов Sigma на 3-и, 7-е и 14-е сутки.

Результаты. Получены полимерные матриксы на основе гомополимера поли-3-гидроксибутирата (П3ГБ), а также сополимеров поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксивалерата (П3ГБ/3ГВ) с включением 3ГВ 12,8 и 22,8%, поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксигексаноата (П3ГБ/3ГГ) с включением 3ГГ 13,6 %, поли-3-гидроксибутирата и поли-4-гидроксибутирата (П3ГБ/4ГБ) с включением 4ГБ 9,5 и 23,1% в виде пленок.

По данным РЭМ снимков полимерных пленок разного химического состава установлено, что топография поверхности полученных образцов имеет некоторые отличия. Поверхность матриксов на основе гомополимера П3ГБ достаточно гладкая и минимально рельефная, тогда как матриксы на основе сополимера П3ГБ/3ГГ имеют развитую шероховатую поверхность. Множественное количество пор зарегистрировано на матриксах П3ГБ/4ГБ с включением 4ГБ 9,5 и 23,1% и П3ГБ/3ГВ с включением 3ГВ 22,8%.

Наибольший краевой угол смачивания воды, имеет матрикс с химическим составом П3ГБ/П3ГВ с включение 3ГВ 12,8% (77,05), который является наиболее гидрофильным. Образцы из П3ГБ/П4ГБ с включением 4ГБ 9,5% и П3ГБ/П3ГВ с включением 3ГВ 22,8%, их углы 67,45 и 68,55, соответственно. имеют более гидрофобную природу. Исследования физико-механических свойств показали, что наибольшем модулем Юнга обладает матрикс из гомополимера (2956,77 МПа), наименьшим сопротивлением из всех образцов обладает матрикс из П3ГБ/4ГБ с включением 4ГБ 23,1% (152,2 МПа). Остальные матриксы обладают промежуточными значениями, при этом данные приближены к наибольшему значению.

Адгезивные свойства пленок исследованы в культуре клеток ММСК-КМ, дифференцированных в клетки остеобластического ряда в течении 14 дней. По данным МТТ теста, к окончанию эксперимента, отмечено общее увеличение клеток на всех исследуемых матриксах, при этом максимальное значение зарегистрировано на пленках из П3ГБ/4ГБ с включением 4ГБ 23,1%.

Высокие значения активности щелочной фосфатазы отмечены только к концу эксперимента во всех группах (14 дней), однако наибольшее значение зарегистрировано на матриксах П3ГБ и П3ГБ/4ГБ с включением 4ГБ 9,5 и 23,1%.

На всех исследуемых образцах в первые сутки отмечено повышение раннего апоптоза, однако на 3 сутки эти значения снижаются. Некроз и поздний апоптоз зарегистрирован в 1 и 2 сутки эксперимента на полимерных пленках из П3ГБ/3ГВ с включением 3ГВ 12,8 и 22,8%.

Отмечена положительная реакция по Von Kossa на всех исследуемых матриксах. После 7 суток культивирования клеток на матриксах, наибольшее количество отложения кальция в виде черных гранул зафиксировано на П3ГБ и П3ГБ/3ГВ с включением 3ГВ 22,8%.

УДК 57.088.1, 57.083.18

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ-БИОДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИН ФРАГМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ ПЦР-ПРОДУКТА ГЕНА 16S $_{р}$РНК

Степина Т.А., Кузнецова Т.Н.,
научный руководитель доц. канд. биол. наук Гусейнов О.А.
Сибирский федеральный университет

Введение

Технический прогресс приводит к широкому внедрению целевых продуктов, синтезируемых микроорганизмами. Ценным продуктом бактерий являются микробные полигидроксиалканоаты, (ПГА) полимеры гидроксипроизводных жирных кислот (т.н. биопластики). ПГА перспективны в качестве разрушаемой упаковки пищи и напитков, предметов гигиены и санитарии. Увеличение объемов выпуска и расширение сфер применения ПГА делают необходимым изучение способности окружающей среды к самоочищению от этих продуктов. Разрушаемость ПГА определяется многими условиями, зависит от многих составляющих, включая собственно химический состав и структуру полимера, микробную составляющую среды как главного агента их биодеградации. Возрастающие требования к охране окружающей среды делают этот класс биополимеров одним из востребованных материалов XXI века. Помимо термопластичности, аналогично полипропилену и полиэтилену, ПГА обладают антиоксидантными и оптическими свойствами, характеризуются высокой биосовместимостью и разрушаемостью в биологических средах [1].

Впервые микроорганизмы, разрушающие ПГА, были выделены более 40 лет назад [2]. Среди них было идентифицированно несколько таксонов – Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces.

Цель работы – определение видового состава бактерий-биодеструкторов полигидроксиалканоатов

В задачи исследования входило:

1. Выделить ДНК из 5 образцов бактерий-деструкторов ПГА
2. Для каждого из этих образцов получить ампликоны 500L – 1350R гена 16S рРНК размером около 900 пар оснований.
3. Провести анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) полученных ампликонов с использованием 7 эндонуклеаз рестрикции: BspFN I, Msp I, Rsa I, Tag I, BstHH I, Sse9 I, Bst MB I.
4. На основе фенотипических признаков данных микроорганизмов найти последовательности гена 16S рРНК подходящих по свойствам бактерий из базы данных «GenBank».
5. Выделить ампликоны 500L – 1350R гена 16S рРНК из этих последовательностей.
6. Провести теоретический анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов полученных ампликонов с использованием выбранных выше эндонуклеаз рестрикции.
7. Сравнить практические и теоретические картины электрофоретического разделения рестриктов данных ампликонов и найти совпадение.
8. По полученным совпадениям сделать вывод о видовой принадлежности исследуемых образцов.

Условия эксперимента

Бактерии-деструкторы ПГА (штаммы 1 – 5) и E. Coli K-12 были предоставлены д.б.н. Прудниковой С.В.(кафедра биотехнологии СФУ)

Выделение хромосомальной ДНК проводили по методу [3].

Амплификацию гена 16S рибосомальной РНК проводили как описано в работе [4].

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 4 ч. при определенной температуре для каждой рестриктазы: BspFN I, Msp I, Rsa I - 37 ^{o}C; Tag I, BstMB I - 65 ^{o}C; BstHH I – 50 ^{o}C; Sse9 I - 55^{o}C в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2ед. акт. рестриктазы производства НПО "СибЭнзим", в соответствующем буфере.

Электрофоретическое разделение продуктов рестрикции амплифицированной ДНК проводили в 1,7% агарозе (Helicon) в трис-баратном буфере с этидиум бромидом (0,5мг/л) при 85 V в течение 2 ч.

Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярной массы ДНК (100bp и 100bp+50 bp ДНК маркеры, НПО "СибЭнзим").

Электрофорез фрагментов ДНК проводили в Камере для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad.

Анализ гидролиза ампликонов гена 16S РНК проводили с использованием гельдокументирующей системы Bio-Rad Gel Doc XR с компьютером.

Результаты и обсуждение

На рис. 1-6 представлены картины электрофоретического разделения рестриктов ампликона 500L – 1350R гена 16S рРНК для рестриктаз BspFN I, Msp I, BstHH I.

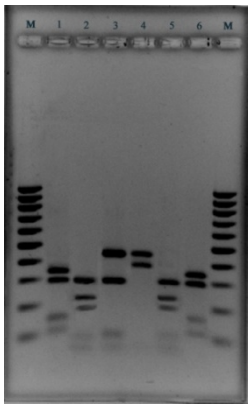


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации гена 16S рРНК бактерий-деструкторов ПГА после обработки рестриктазой BspFN I
M – Маркер 100 bp
1 – Штамм 1
2 – Штамм 2
3 – Штамм 3
4 – Штамм 4
5 – Штамм 5
6 – Escherichia coli K-12

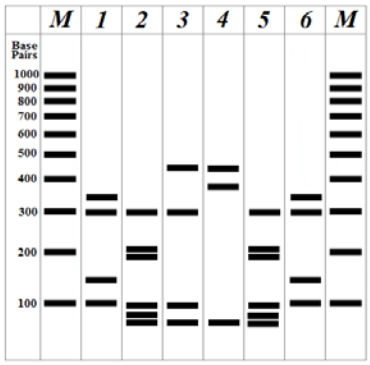


Рис. 2. Теоретически рассчитанные картины электрофоретического разделения продуктов амплификации генов 16S рРНК, после обработки рестриктазой BspFN I
M – Маркер 100 bp
1 – Klebsiella pneumoniae str. B8.1.2
2 – Bacillus cereus str. 55-3
3 – Bacillus amyloliquefaciens Ab-525
4 – Bacillus pumilius GR36
5 – Bacillus cereus str. 55-3
6 – Escherichia coli K-12

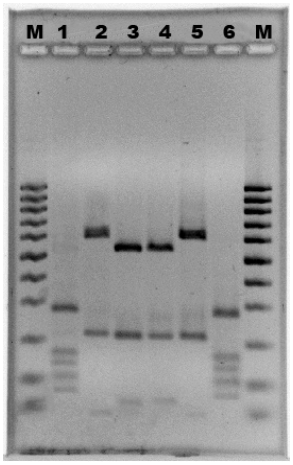


Рис. 3. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации гена 16S рРНК бактерий-деструкторов ПГА после обработки рестриктазой Msp I
M – Маркер 100 bp
1 – Штамм 1
2 – Штамм 2
3 – Штамм 3
4 – Штамм 4
5 – Штамм 5
6 – Escherichia coli K-12

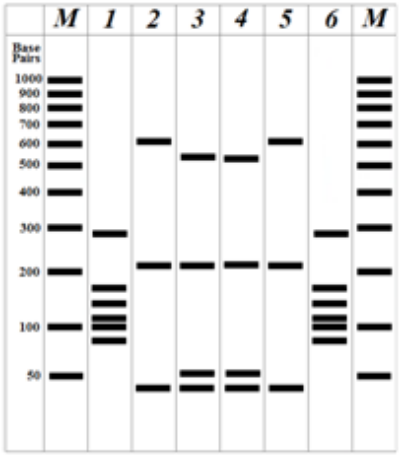


Рис. 4. Теоретически рассчитанные картины электрофоретического разделения продуктов амплификации генов 16S рРНК, после обработки рестриктазой Msp I
M – Маркер 100 bp
1 – Klebsiella pneumoniae str. B8.1.2
2 – Bacillus cereus str. 55-3
3 – Bacillus amyloliquefaciens Ab-525
4 – Bacillus pumilius GR36
5 – Bacillus cereus str. 55-3
6 – Escherichia coli K-12

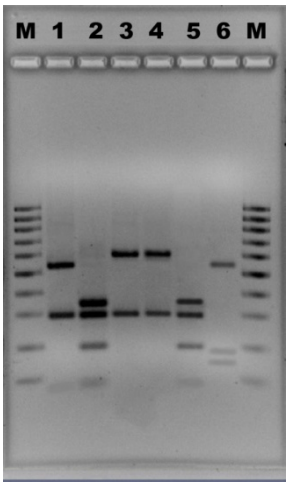


Рис. 5. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации гена 16S рРНК бактерий-деструкторов ПГА после обработки рестриктазой BstHH I
M – Маркер 100 bp
1 – Штамм 1
2 – Штамм 2
3 – Штамм 3
4 – Штамм 4
5 – Штамм 5
6 – Escherichia coli K-12

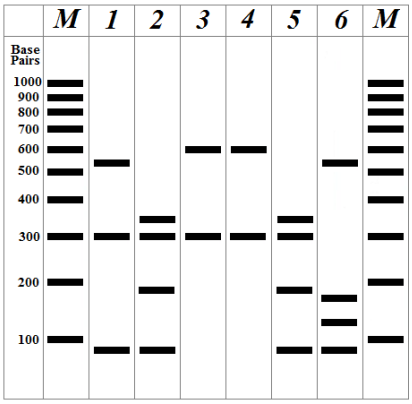


Рис. 6. Теоретически рассчитанные картины электрофоретического разделения продуктов амплификации генов 16S рРНК, после обработки рестриктазой BstHH I

M – Маркер 100 bp
1 – Klebsiella pneumoniae str. B8.1.2
2 – Bacillus cereus str. 55-3
3 – Bacillus amyloliquefaciens Ab-525
4 – Bacillus pumilius GR36
5 – Bacillus cereus str. 55-3

6 – Escherichia coli K-12

В представленной ниже таблице приведены результаты расщепления рестриктазами ампликонов для E. coli K-12 и штаммов бактерий из базы GenBank, которые дают аналогичную картину разделения с изучаемыми штаммами.

Штамм бактерий	**Идентификатор в GenBank**	**Размеры рестриктов (пн) для разных рестриктаз**		
		Bsp FN I	**Msp I**	**BstHH I**
E. coli K-12	NR_102804	340 295 141 104 14	280 162 137 106 101 81 23 4	531 164 136 63
Klebsiella pneumoniae str. B8.1.2	KJ725222	340 295 141 104 14	284 162 137 106 101 81	531 300 63
Bacillus cereus str. 55-3	KM187654	294 209 186 87 50 39 15 14	606 211 43 23 11	346 299 182 63 4
Bacillus amyloliquefaciens Ab-525	KJ879953	446 294 87 39 15	540 211 59 43 23 11 9	597 299
Bacillus pumilius GR36	KC771051	445 381 39 15 14	538 211 59 43 3 11 9	595 299

Из сопоставления теоретических и практических электрофореграмм распределения рестриктов для данных рестриктаз, а также, для рестриктаз Tag I, Rsa I, Sse9 I, Bst MB I можно сделать вывод, что идентифицируемые нами штаммы являются представителями видов: *Klebsiella pneumoniae, Bacillus cereus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus pumilius.*

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов в совокупности с использованием генетической базы данных секвенированных последовательностей ДНК («GenBank») может служить достаточно простым способом идентификации микроорганизмов. Метод рестрикционного анализа не так чувствителен к наличию примесей в ДНК по сравнению с полимеразной цепной реакцией, используемой для секвенирования последовательности продукта амплификации гена 16S РНК.

Список литературы

1. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И./ Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение – Красноярск, Издательство «Красноярский писатель», 2011. – 392с.
2. Chowdhury, A.A. (1963). Poly-b-hydroxy buttersaure abbauende Bakterien und Exoenzyme. Arch. Mikrobiol .47: 167-200.
3. Метод выделения ДНК - [Электронный ресурс] - Режим доступа http://www.serva.de/www_root/documents/02xyPrep%20Bacterial%20genomic%20DNA__%20Miniprep%20Kit%207%20pages12%2011_1.pdf (дата обращения 2.02.15)
4. Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Sasaki, M., Kaneko, M. // J. Clin. Microbiol. - 1997. - V. 35. - P. 2458-2463.

УДК 579.6

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА БИОРАЗРУШАЕМЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

Сырвачева Д. А.,
научный руководитель д-р биол. наук Волова Т. Г.
Сибирский федеральный университет

Природные полиэфиры полигидроксиалканоаты (ПГА) синтезируют прокариотические микроорганизмы в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса. Среди этого класса природных макромолекул описаны разнообразные по структуре полимеры, образованные мономерами различного химического строения (насыщенные и ненасыщенные, линейные и разветвленные, алифатические, ароматические и др.) с различной длиной С-цепи [1]. ПГА-синтаза – один из ключевых ферментов синтеза этих полимеров, катализирует формирование эфирных связей в процессе полимеризации мономеров [2]. На основании представления о субстратной специфичности ПГА-синтаз все известные типы ПГА разделены на три группы: короткоцепочечные ($ПГА_{КЦ}$) (scl-PHA), среднецепочечные ($ПГА_{СЦ}$) (mcl-PHA) и длинноцепочечные ($ПГА_{ДЦ}$) (lcl-PHA). $ПГА_{КЦ}$ состоят из мономеров с длиной углеродной цепи от трех до пяти атомов (C_3-C_5), $ПГА_{СЦ}$ – от C_6 до C_{14} и $ПГА_{ДЦ}$ – свыше C_{17} и C_{18}.

ПГА - класс биоматериалов, обладающих комплексом полезных свойств - термопластичностью, биосовместимостью с животными тканями, антиоксидантностью, а также разрушаемостью в природной среде под действием ферментов почвенной микрофлоры на безвредные для живой и неживой природы компоненты без образования токсичных продуктов. Все это делает перспективным их использование в различных сферах деятельности человека, а именно, в сельском хозяйстве, медицине, фармакологии, пищевой промышленности и т. д.

Наибольший интерес вызывают сополимерные ПГА. Связано это с тем, что в зависимости от состава и соотношения мономеров в ПГА их базовые физико-химические свойства изменяются в широких пределах [3]. Прежде всего, это относится к степени кристалличности и температурным характеристикам - параметрам, которые определяют условия переработки полимеров и характеристики получаемых изделий. Особое место среди ПГА занимают сополимеры, образованные коротко- (scl) и среднецепочечными (mcl) мономерами, так как сополимеры такого типа, например, сополимеры 3-гидроксибутирата и 3-гидроксигексаноата (П(3ГБ/3ГГ)), а также 3-гидроксибутирата, 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата (П(3ГБ/3ГВ/3ГГ)) обладают свойствами эластомеров и характеризуются пониженной степенью кристалличности в отличие от гомогенного высококристалличного поли-3-гидроксибутирата (П3ГБ) и сополимеров 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом (П(3ГБ/3ГВ)) [3].

Способностью синтезировать сополимерные ПГА, образованными коротко- (scl) и среднецепочечными (mcl) мономерами, обладают природные и генетические сконструированные микроорганизмы. Среди описанных природных продуцентов scl-mcl ПГА - представители различных таксонов: *Pseudomonas putida* (Wang et al., 2011), *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodococcus ruber*, *Thiocapsa pfennigii*, *Aeromonas caviae* 440, *Pseudomonas sp.* 61-3, *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* и др., и этот список пополняется. В этих работ описаны процессы синтеза scl-mcl ПГА на различных субстратах (сахарах, органических и жирных кислотах), которые служили основным источником углерода. В состав сред вносили также дополнительные углеродные субстраты, так называемые субстраты-предшественники синтеза среднецепочечных мономеров, которые в подавляющем большинстве ингибируют рост микроорганизмов – продуцентов ПГА

(соли гексаноата, октаноата и др.). При этом полученные общие выходы ПГА были далеки от потенциально возможных, а доля в них среднецепочечных мономеров – низка. Так, достигнутые уровни включения гексаноата в ПГА, опубликованные до недавнего времени, составляли от единиц до десятков мол.% и не превышали 15-20 мол.%.

Целью настоящей работы явилось исследование способности природного штамма *Cupriavidus eutrophus* B10646 синтезировать трехкомпонентные ПГА с высоким включением фракции 3-гидроксигексаноата, а также изучение физико-химических характеристик, полученных образцов.

Культивирование бактерий проводили в гетеротрофных условиях в течение 120 часов. В качестве основного углеродного субстрата использовали глюкозу (10 г/л), в качестве субстратов-предшественников для синтеза мономеров 3-гидроксивалерата (3ГВ) и 3-гидроксигексаноата (3ГГ) – соли валериановой или пропионовой кислоты и соли 3-гексановой кислоты, соответственно. Для увеличения содержания мономеров 3ГГ в сополимерах в среду добавляли акрилат натрия в качестве ингибитора пути *β*-окисления жирных кислот.

В ходе экспериментов варьировали соли С5 кислот (валерат натрия или пропионат натрия) и их концентрацию в среде (от 0,5 до 1,0 г/л). При этом гексаноат натрия и акрилат натрия в среду добавляли фиксированное количество (2,0 и 0,2 г/л, соответственно) в каждом эксперименте. Добавки предшественников в течение всего эксперимента осуществляли дробно.

При добавлении валерата натрия в количестве 0,7 г/л содержание полимера в клетке и включение в него scl и mcl мономеров было высоким относительно других экспериментов и составляло 44 % и 33 мол.% и 15 мол.%, соответственно. Уменьшая или увеличивая подачу валерата натрия, выход полимера и содержание 3ГГ мономеров снижались до 38-40 % и 7-10 мол.%, соответственно, однако при концентрации валерата натрия в среде 1,0 г/л увеличился урожай биомассы (с 3,5 до 4,7 г/л), а включение фракции 3ГВ было максимальным и составляло 41 мол.%. Результаты экспериментов представлены на рисунке 1.

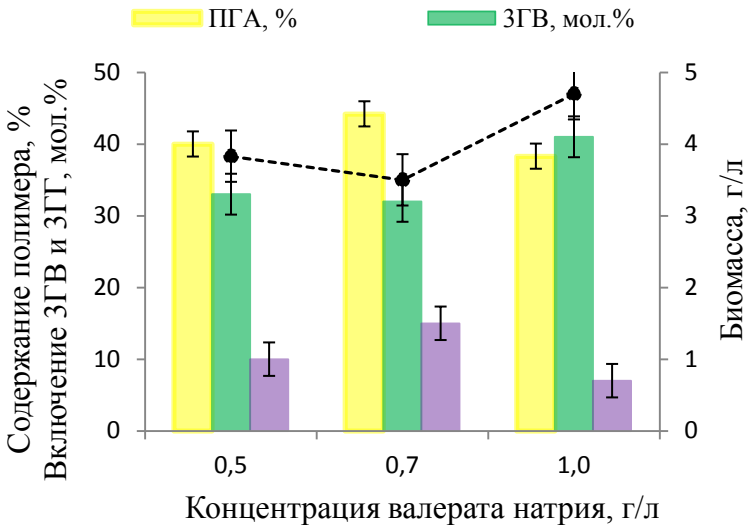


Рис.1. Влияние различных концентраций валерата натрия на синтез сополимеров П(3ГБ/3ГВ/3ГГ) бактериями Cupriavidus eutrophus B10646 в гетеротрофных условиях (субстрат - глюкоза). Гексаноат натрия подавали в количестве 2,0 г/л, акрилат натрия – 0,2 г/л.

Напротив, при использовании соли пропионовой кислоты в качестве предшественника синтеза 3ГВ мономеров при минимальной концентрации пропионата натрия (0,5 г/л) наблюдали максимальный выход полимера и содержание 3ГГ - 52 % и 55 мол.%, соответственно. В то время как при концентрации 0,7 и 1,0 г/л содержание полимера и мономеров 3ГВ и 3ГГ в нем резко уменьшилось и практически не отличалось между собой (рис.2). С целью увеличения содержания фракции 3-гидроксигексаноата в полимере добавка гесаноата натрия была увеличена в 2,5 раза. Тем самым удалось синтезировать сополимер с включением 3ГГ 42,5 мол.%. При этом общее содержание полимера в клетке также стало выше и составляло до 50 % от веса сухого вещества. Урожай биомассы во всех экспериментах находился в диапазоне от 4 до 4,5 г/л.

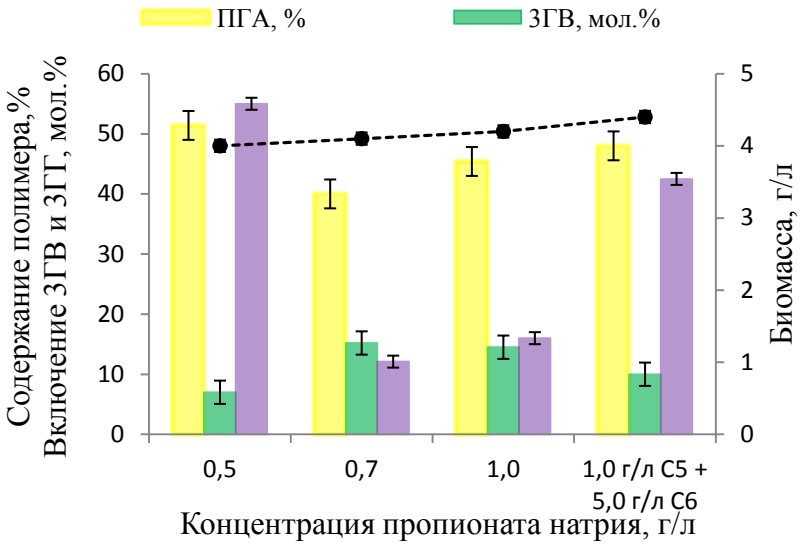


Рис.2. Влияние различных концентраций пропионата натрия на синтез сополимеров П(3ГБ/3ГВ/3ГГ) бактериями Cupriavidus eutrophus B10646 в гетеротрофных условиях (субстрат - глюкоза). Гексаноат натрия подавали в количестве 2,0 г/л, акрилат натрия – 0,2 г/л.

Таким образом, синтезирована линейка сополимеров П(3ГБ/3ГВ/3ГГ) с различным соотношением 3ГБ, 3ГВ и 3ГГ мономеров (таблица 1). Варьируя подаваемые в среду субстраты-предшественники, а также их концентрацию получили трехкомпонентные П(3ГБ/3ГВ/3ГГ) с включением 3ГВ от 7 до 41 мол.% и 3ГГ от 2 до 55 мол.%.

С применением современных методов анализа в сравнительном аспекте исследованы физико-химические (молекулярная масса, степень кристалличности, температуры плавления и термической деградации) свойства. По сравнению с гомогенным П3ГБ сополимеры имели отличия по ряду показателей, которые были выражены в различной степени в зависимости от типа 3ГВ и 3ГГ мономеров и их содержания в сополимере.

Таблица 1. Состав ПГА и физико-химические свойства сополимеров П(3ГБ/3ГВ/3ГГ), использованных для получения пленок

№ п/п	Состав ПГА, мол.%			$M_ч$, кДа	$M_в$, кДа	ПД	$C_х$, %	$T_{пл}$, °C	$T_{дегр}$, °C
	3ГБ	3ГВ	3ГГ						

1	100	0	0	365	920	2.52	76	178	295
2	52	41	7	135	480	3.55	60	156	282
3	70	14	16	122	511	4.20	61	155	271
4	38	7	55	163	719	4.40	52	169	270

При изучении свойств полученных образцов ПГА зависимости молекулярной массы от состава и содержания сополимеров не обнаружено. Так, средневесовая молекулярная масса (Мв) находилась в пределах от 480 до 719 кДа, среднечисловая (Мч) – от 122 до 163 кДа. Тем не менее, показано, что молекулярная масса сополимерных образцов значительно ниже, чем у П3ГБ (920 кДа и 365 кДа, соответственно). В тоже время наблюдалось явное снижение значений степени кристалличности (до 52 %) по сравнению с гомополимером (76 %). Показатели температурных характеристик также заметно снижены относительно гомополимера. Так, температура плавления (Тпл.) составляла 155-169 ^{o}C, температура термической деградации (Тдегр.) – 270-282 ^{o}C в сравнении с П3ГБ, у которого температура плавления и температура термической деградации составляли, соответственно, 178 и 295 ^{o}C. Однако зависимости содержания мономеров 3ГВ и 3ГГ в полимере и Тпл. и Тдегр. не зафиксировано.

Таким образом, выявлено, что природный штамм бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 способен синтезировать трехкомпонентные ПГА с высоким включением фракции 3-гидроксигексаноата (до 55 мол.%). Установлено, что полученные сополимеры П(3ГБ/3ГВ/3ГГ) в сравнении с гомополимером П3ГБ имеют более низкую степень кристалличности и более низкие значения температуры плавления и термической деградации, что делает их более пластичными и эластичными и, следовательно, более перспективными для изготовления различных изделий.

Список литературы

1. Valentin HE and Steibüchel A, Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid synthases. Appl Microbiol Biotechnol 40:699-709 (1994).

2. Rehm BHA, Polyesters synthases: natural catalysts for plastics. J Biochem 376: 15–33 (2003).

3. Laycock B, Halley P, Pratt S, Werker A, Lant P, The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoate. Prog Polym Sci 38:536–583 (2013).

4. Wang HH, Zhou XR, Liu Q, Chen G, Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. Appl Microbiol Biotechnol 89: 1497-1507 (2011).

5. Sudesh K, Abe H, Doi Y, Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog Polym Sci 25:1503–1555 (2000).

УДК 577.114.4, 543.554

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ СТЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ СТЕНТИРОВАНИЯ МОЧЕТОЧНИКОВ

Усенко В.В.,
научный руководитель Бояндин А.Н.
Сибирский федеральный университет

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых материалов медицинского назначения, предназначенных для контакта со средой живого организма, представляет собой задачу высокой сложности. Особо востребованы специализированные биосовместимые материалы для клеточной и тканевой инженерии, связанные с реконструктивной хирургией и разработкой биоискусственных органов. [1, С. 6]

В настоящее время все актуальнее становится проблема, связанная с нарушением проходимости мочеточников, что возможно при заболеваниях различной природы и локализации. Постепенное развитие нарушения проходимости мочеточников приводит к хронической почечной недостаточности, к атрофии почечной паренхимы, к гидронефротической трансформации почек, азотемии.

Характерным направлением развития современной медицины является стремление к минимальной инвазивности используемых в клинической практике методов лечения. Стентирование, представляющее собой по сути внутрипросветное дренирование, в рамках этих тенденций нашло широкое применение не только в кардиологии, но и в урологии. В современной урологической практике лечение многих заболеваний верхних мочевых путей уже сложно представить без использования внутренних (не сообщающихся с внешней средой) стентов. [2]

Среди материалов, разрабатываемых и исследуемых, применительно к этим задачам, - полигидроксиалканоаты (ПГА), линейные полиэфиры микробиологического происхождения, являются наиболее перспективными. Полигидроксиалканоаты самостоятельно могут выполнять роль каркаса (матрикса), а также использоваться в сочетании (композиции) с известными биоматериалами для улучшения их биосовместимости и физико-механических свойств.

Цель настоящей работы: конструирование и исследование полимерных стентов на основе полигидроксиалканоатов для урологии

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования были взяты образцы полимеров: поли-3-гидроксибутирата (П-3-ГБ); сополимер поли-3-гидроксибутирата с поли-3-гидроксивалератом (П-3-ГБ-со-П-3-ГВ) с включением последнего 7,5%; сополимер поли-3-гидроксибутирата с поли-4-гиброксибутиротом (П-3-ГБ-со-П-4ГБ) с включением последнего 5%; поли-4-гидроксибутират (П-4-ГБ); сополимер поли-3-гидроксибутирата с поликапролактоном (П-3-ГБ-со-ПКЛ) с включением ПКЛ 90%; сополимер поли-3-гидроксибутирата с поликапролактоном (П-3-ГБ-со-ПКЛ с включением последнего 75%.

Экспериментальным путем получали серии образцов стентов из полимерных растворов разной концентрации: 2%, 3%, 10%, 15% и 20%. Для конструирования одного стента из 2% раствора использовали 0,1 гр. полимера и растворяли в 5 мл хлороформа при постоянной t = 57◦С на водяной бане. Полимерные стенты получали двумя методами.

Физико-механические характеристики образцов регистрировали на универсальной электромеханической испытательной машине Instron 5565,5 KN

(Великобритания). Исследовали следующие параметры: напряжение при растяжении (Па), средний модуль Юнга (ПА) и среднее удлинения (%).

Микроструктуру поверхности полимерных стентов исследовали с применением сканирующей электронной микроскопии (РЭМ-100У, Россия). Внешний вид матриксов фиксировали с помощью фотокамеры.

Предварительно стерилизованные H_2O_2 плазмой полимерные стенты l=2,5 см, помещали в катетеры с естественным сохранением тока мочи на 16 и 30 дней. По окончанию эксперимента оценивали массу стентов, подверженность колонизации штаммами уропатогенных бактерий и инкрустации урокристаллами. Элементный состав на поверхности полимерных стентов исследовали с помощью компьютерной программы QUANTAX.

Биосовместимость сконструированных стентов была изучена на кроликах (самцах) породы Шиншила массой 2-2,5 кг при реконструкции мочеполовой системы. Полимерные стенты были установлены в мочеточник кролика на границе между лоханкой и мочеточником в течение 14 дней. В качестве контроля использовали коммерческий стент на основе полиуретана (NONSTONE).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получена и разработана серия образцов стентов из полимерных растворов разной концентрации и состава.

В ряду экспериментов было выяснено, что полимерные стенты из раствора П-3-ГБ обладают жесткостью и подвергаются разрыву, стенты полученные из раствора П-3-ГБ-со-П-3-ГВ с включением последнего 7,5% более эластичнее предыдущих. Образцы из раствора П-4-ГБ имеют хорошие показатели эластичности, но полимер трудно синтезируем. Полимерные стенты из раствора П-3-ГБ-со-ПКЛ по показателям превосходят полиуретановые трубки. Данный комплекс обладает хорошей эластичностью, упругостью и способностью сопротивляться разрыву.

Доказано, что до 30 суток поверхность полимерных стентов не подвергалась инкрустации урокристаллами, и элементный состав соответствовал элементному составу мочи.

После установления полиуретановых стентов в мочеточник кроликов наблюдается продуктивное воспаление эпителия, преобладание клеток макрофагального ряда с гранулоцитами. В экспериментальной группе при имплантации полимерного стента, наблюдали умеренную воспалительную реакцию. Без участков некроза. Таким образом при гистологических исследованиях было выявлено, что полимерные стенты биосовместимы, вызывают меньшее воспаление и подходят для реконструкции мочевыводящих путей.

Список литературы

1. Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: электрон. учеб. пособие: ИПК СФУ, 2009.

2. Slepian M.J.. Urologycal stents: material, mechanical and functional classification. In: book by Yachia D. Stenting the urinary system.- Oxford, 1998: p.3-11.

УДК 159.963.27

НАРУШЕНИЯ СНА У ДЕТЕЙ ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

Ференс Ю.С., Новрузова М.Б.
научный руководитель канд.биол.наук Севостьянова М.В.
Южный Федеральный Университет

Сон обеспечивает нормальную жизнедеятельность человека в любом возрасте, а особенно на ранних этапах развития ребенка. Недостаточный сон, нарушенный по той или иной причине, усиливает дневную сонливость и может привести к обширному спектру изменений всех нервных и нейроэндокринных функций, включая повышенный уровень гормонов стресса, когнитивные и обменные нарушения, снижение иммунитета, повышение риска онкологических и сердечнососудистых заболеваний. Избыточная световая стимуляция и поведенческая активность человека в ночное время - самые обычные причины нарушений циркадного и сонного ритма [1].

Подросткам вследствие возрастных изменений в организме, связанных с половым созреванием, требуется в средней от 8,5 до 9 часов сна в сутки, а по существу, они в среднем спят всего по 7,5 часов. При недостаточно продолжительном сне подростки чувствуют себя разбитыми, не могут сосредоточиться на уроках. Интенсивные занятия в школе, повышенная физическая и эмоциональная нагрузка, неполноценный отдых, могут вызывать нарушения сна. Это довольно тревожный сигнал – согласно исследованиям ученых из Мичиганского университета, дети, которые регулярно не высыпаются, вдвое чаще начинают курить, употреблять алкоголь и наркотики, в отличие от сверстников соблюдающие режим [2].

Помимо физиологических изменений в организме, характерные для подросткового периода, к нарушению сна также могут привести следующие факторы: неправильный режим дня, чрезмерная умственная, эмоциональная и физическая нагрузка, неправильное питание, общение в социальных сетях допоздна и другие причины.

Целью нашего исследования было выявление нарушений сна у детей среднего и старшего школьного возраста, а также определение хронобиотипов учащихся. В обследовании приняло участие 52 испытуемых 11- 16 лет, обучающийся в 6, 8 и 10-х классах лицея № 1, города Аксай.

Для определения дневной сонливости, продолжительности и качества сна, было проведено анкетирование. Мы использовали шкалу Epworth sleepiness scale и специализированную анкету для определения качества сна, а также тест Остберга в модификации проф. С.И. Степановой для определения хронобиотипов учащихся.

В процессе исследования были получены следующие данные (Таблица 1)

Таблица 1. Сонливость у детей разного возраста

Возраст	**Норма**	**Начальная степень дневной сонливости**	**Умеренная сонливость**	**Выраженная сонливость**

12-13 лет (23 чел.)	56,5 %	21,7 %	17,4 %	4,3 %
14 лет (19 чел.)	63,1 %	10,5 %	15,8 %	10,5 %
15-16 лет (10 чел.)	20 %	30 %	50 %	0 %
Всего - 52 чел.	52 %	19,2 %	23 %	5,8 %

Было зафиксировано, что большинство школьников спят менее 8 часов в сутки, что составляет 52 % от общего числа учащихся (27 учеников). Это подтверждается высоким процентом дневной сонливости - 48%.

Начальную степень дневной сонливости имеют 19,7 % учеников, умеренную сонливость имеют 23 %, выраженную - 5,8 %.

Большинство школьников после пробуждения чувствуют себя вялыми и не выспавшимися, что составляет 52 % от общего числа учеников. 5,8 % чувствуют себя плохо и только 42,3 % учащихся чувствуют себя отдохнувшими и выспавшимися после сна.

Также было зафиксировано, что бессонницей страдают 15,2 % детей. Просыпаются среди ночи 42,3 % учащихся, из них 3,8 % несколько раз за ночь. Ночные кошмары мучают 26,9 % учеников. А у 25 % школьников повышенный уровень двигательной активности (частые переворачивание, покалывание в конечностях, судороги).

Также в процессе исследования были определены хронобиотипы учащихся, которые отражены в таблице (Таблица 2).

Результаты, проведенного исследования представлены в таблице в процентном соотношении:

Таблица 2.Распределение хронотипов среди учащихся 6-10 классов

Возраст / **Хронотип**	**12 лет**	**13 лет**	**14 лет**	**15 лет**	**16 лет**
	20 чел.	**5 чел.**	**17 чел.**	**4 чел.**	**6 чел.**
«Жаворонок» - чётко выраженный утренний тип	5 %	0	0	25%	0

Слабо выраженный утренний тип	5%	20%	5,9%	0	33,3%
«Голубь» - индифферентный тип	80%	60%	58,8%	25%	50%
Слабо выраженный вечерний тип	10%	20%	35,3%	0	16,7%
«Сова» - сильно выраженный вечерний тип	0	0	0	50%	0

Результаты тестирования учащихся лицея № 1 города Аксая показали, что подавляющее большинство учеников (33 человек) относится к дневному хронобиотипу – «голубь». Они оставляют 63,5 % от общего числа учащихся.

К сильно выраженному утреннему типу «жаворонок» относится наименьшее количество учащихся, всего по одному человеку в 6 и 10-м классах, что составило 3,8%.

Слабо выраженным утренним типом обладают 5 учеников, что составляет 9,6 % от общего числа исследуемых, а к слабо выраженному вечернему типу относятся 10 учащихся, что соответствует 19,3%.

К сильно выраженному вечернему типу «сова» принадлежит 2 учащихся, что составляет 3,8%.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что те или иные проблемы со сном имеют 52 % школьника. Этому свидетельствует данные о снижении качества сна и достаточно высокий процент дневной сонливости. По данным исследования, большинство школьников спят менее 8 часов в сутки, что крайне недопустимо в подростковом возрасте. Также следует отметить, что наиболее распространенным хронобиотипом среди школьников 11, 12, 13,14,15 и 16-ти лет является индифферентный тип «голубь». Для учащихся с таким хронобиотипом характерна относительно равномерная трудоспособность на всем протяжении периода бодрствования.

Проведенное нами исследование особенно важно для родителей учащихся, ведь именно они знают, как тяжело поднимать ребенка с постели в ранние утренние часы. А вечером его не легче уложить спать - в это время он наиболее активен. Однако есть дети, которые любят рано вставать и охотно укладываются спать. Подобные различия сохраняются на всю жизнь. Понимание и правильная интерпретация различных физиологических процессов, происходящих в живом организме при действии различных факторов, невозможны без знания природы биологических ритмов – хронобиотипов. Знание закономерностей биологических ритмов помогает правильно строить режим тренировочных занятий, смены нагрузок и отдыха, своевременных восстановительных мероприятий, правильно распределять время для учебного процесса. Совершенно необходимо учитывать биологические ритмы в воспитательном процессе — для физической деятельности, организации рационального режима питания, осуществления контроля за развитием ребёнка.

Родителям школьников, среди которых было проведено исследование, следует обратить внимание на гигиену сна и установить правильный режим дня для ребенка, так как, даже незначительные нарушения сна могут нанести серьезный вред здоровью.

Список литературы

1. Ковальзон В. М. Основы сомнологии. Физиология и нейрохимия цикла "бодрствование-сон" – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014 – 272 с.

2. Смирнов В. М. Нейрофизиология и высшая нервная деятельность детей и подростков: Учеб. пособие для студ. высш. пед. учеб. заведений. – 2-е изд.,стереотип. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 364 с.

УДК 616.155.191-021.3

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В 12 ЭКЗОНЕ ГЕНА JAK2 У JAK2V617F«-» ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ ИСТИННАЯ ПОЛИЦИТЕМИЯ

Харсекина А.Е.
научные руководители канд. биол. наук Субботина Т.Н.,
канд. мед. наук Ольховский И.А.
Сибирский федеральный университет,
Красноярский филиал гематологического научного центра
Министерства здравоохранения России

Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) – это группа Ph-негативных гематологических заболеваний, сопровождающихся опухолевой трансформацией с последующей пролиферацией миелоидных клеток, длительно сохраняющих способность к дифференцировке. Истинная полицитемия (ИП) наряду с другими патологиями входит в группу хронических миелопролиферативных заболеваний. Доказано, что ключевым моментом в патогенезе всей группы хронических миелопролиферативных заболеваний, не ассоциированных с BCR-ABL, считается активация JAK-STAT сигнального пути, обусловленная чаще всего точечной мутацией V617F (rs10974944) в 14 экзоне гена JAK2 (Янус-киназа-2), обнаруженной в 2005 году и встречающейся практически в 85-95% случаях при ИП. Соматическая мутация Jak2 V617F, заключающаяся в замене гуанина на тимин в положении 1849 экзона 14 на коротком плече хромосомы 9p24, приводит к замене валина на фенилаланин в кодоне 617 полипептидной цепи JAK 2, и вызывает нарушение структуры тирозинкиназы, отдаление киназных доменов, их самоактивацию и появление высокой активности тирозинкиназы, что приводит к активации пролиферации клетки и блокаде процессов апоптоза. Вслед за JAK2 V617F были обнаружены другие соматические мутации, приводящие к развитию различных нозологических форм ХМПЗ: истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и миелофиброз (МФ). В частности, для небольшого числа JAK2V617F-отрицательных больных с диагнозом ИП был открыт кластер мутаций гена JAK2 в 12 экзоне, затрагивающий аминокислотные остатки в положении 506–547 белка Jak2. До настоящего времени описано 42 вида мутаций в данной области, обуславливающих развитие ИП. Частота встречаемости таких мутаций составляет примерно 5% для европейской популяции и 15% для китайской популяции среди пациентов с диагнозом ИП. Для российской популяции соответствующие данные отсутствуют. Мутации в 12 экзоне вызывают увеличение числа клеток только эритроцитарного ростка по схожему механизму, что и мутация в 14 экзоне этого же гена.

Белок Янус-киназы-2 состоит из нескольких доменов: киназного, псевдокиназного, домена SH2 и FERM. Этот белок обладает каталитической активностью. За эту активность отвечает киназный домен. А псевдокиназный домен является гомологом киназного домена, но он не имеет каталитической активности. Предполагается, что его функция заключается в подавлении активности киназного домена. Но возникающая мутация V617F и мутации в 12 экзоне приводят к конформационным изменениям в белке, вследствие чего происходит пространственное удаление псевдокиназного домена, разрывается ингибирующее взаимодействие между киназным и псевдокиназным доменами. Это приводит к постоянной активности киназного домена и белка в целом.

Определение мутаций в 12 экзоне имеет решающее значение для диагностики и мониторинга терапии истинной полицитемии. В связи с этим актуально определять

данную мутацию не только качественными методами, позволяющими интерпретировать результат как наличие или же отсутствие мутации, но и количественными методами, позволяющими определить аллельную нагрузку, то есть количество аллелей данного гена, пораженных мутацией, выраженное в процентах от общего числа аллелей.

Таким образом, целью данной работы явилось разработать алгоритм анализа соматических мутаций, а также провести анализ отобранных проб на наличие мутаций в 12 экзоне гена JAK2 у пациентов с отсутствием мутации V617F и подтвержденным диагнозом ИП.

На первом этапе работы нами был разработан алгоритм анализа пациентов с подозрением на ИП. Согласно предложенному алгоритму все пациенты с подозрением на ИП должны быть протестированы на наличие основной точечной мутации V617F. Обнаружение данной мутации однозначно свидетельствует о наличии диагноза ИП. Те пациенты, в ДНК которых не была обнаружена данная мутация, должны быть протестированы на наличие какой-либо мутации в 12 экзоне данного гена. Если мутация выявляется, то это также однозначно свидетельствует о диагнозе ИП. Если же мутации отсутствуют, то следует склоняться к диагнозу вторичный эритроцитоз. В то же время следует помнить, что чувствительность используемых технологий анализа данных мутаций не обладает 100%-ной чувствительностью и поэтому есть вероятность пропустить мутацию, если она присутствует у пациента в очень небольшом количестве клеток.

На следующем этапе работы из всего архива биологических проб Красноярского гематологического центра были отобраны 11 образцов ДНК пациентов с подтверждённым диагнозом ИП и не имеющих мутацию V617F. Далее выбранные пробы были протестированы методом пиросеквенирования совместно с нашими коллегами из ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (Москва). По предварительным результатам работы одна проба из 11-ти содержит соматическую мутацию (N542-E543 del) в исследуемом участке 12 экзона. Мутация определена методом de novo пиросеквенирования на приборе «Piromark Q24», (Рисунок. 1).

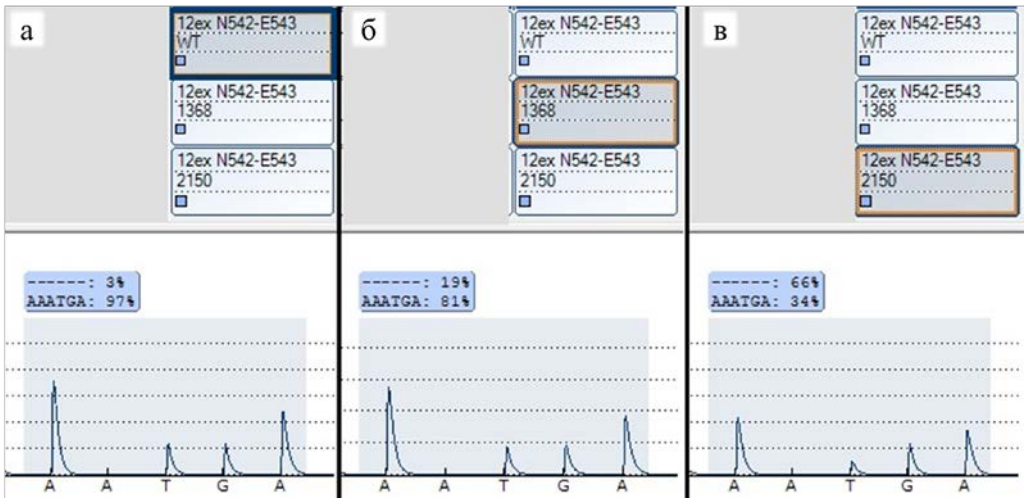


Рисунок 1. участки пирограмм, полученных при анализе ДНК пациента без мутации (а); ДНК, содержащая мутацию (N542-E543 del), выделенная из лейкоцитов пациента №1368 в 2013 году (б); ДНК, содержащая мутацию (N542-E543 del), выделенная из лейкоцитов пациента №2150 в 2015 году (в).

Нужно отметить, что у данного пациента с течением времени произошло увеличение аллельной нагрузки, что, скорее всего, связано с прогрессией заболевания. Картина крови пациента «К» в пробах, которые были взяты в разное время: в июле 2013 годи и в январе 2015 года выглядела следующим образом. Количество эритроцитов выше нормы в обоих случаях (6,5*10^12кл/л; 9,76*10^12кл/л), во втором случае гораздо выше, наблюдается эритроцитоз. Лейкоциты находятся в пределах нормы (5,14*10^9кл/л; 8,13*10^9кл/л), но относительно 2013 года они повысились. Количество тромбоцитов в первом и втором случае находится в пределах нормы, тут следует отметить, по литературным данным известно, что у пациентов с мутациями в 12 экзоне гена JAK 2 чаще всего не обнаруживается тромбоцитоз, в отличии от пациентов с мутацией в 14 экзоне. Гематокрит в первом и во втором случае находится выше нормы, во втором случае гораздо выше. За время лечения пациент не получал циторедуктивной терапии, а проводились только эксфузии крови.

После пиросеквенирования мы провели вертикальный электрофорез на полиакриламидном 8%-ом геле, результаты которого представлены на рисунке 10, где основной продукт и продукт с мутацией разделились так как и должно быть, т.е. мутантный аллель ниже, но кроме этого выявили гетеродуплексы, образованные фрагментами дикого типа и фрагментами с мутациями.

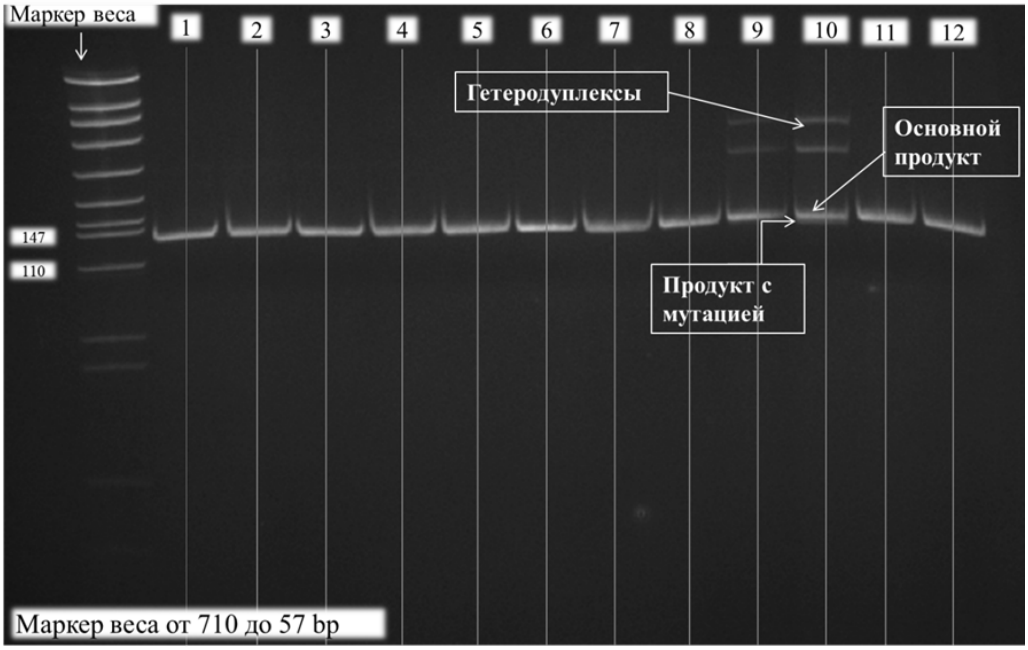


Рисунок 10. Результаты гель-электрофореза.

Данный метода ПЦР с использованием электрофореза можно использовать для дальнейшего качественного (неколичественного) анализа мутаций в 12 экзоне, что по себестоимости будет гораздо дешевле метода пиросеквенирования и позволит использовать дорогостоящий метод пиросеквенирования для уточнения типа мутации и для количественной оценки аллельной нагрузки лишь в тех пробах, которые заранее охарактеризованы более дешёвыми методами.

Таким образом, нами предложен алгоритм анализа соматических мутаций при подозрении на ИП, а также проведена предварительная работа по обнаружению соматических мутаций в 12 экзоне гена JAK2 методами пиросеквенирования и ПЦР с электрофоретической детекцией. Выявлен 1 пациент с мутацией N542-E543 del.

УДК 616.72-002.772

ОБЩИЙ АНАЛИЗ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Чеглова Ю.Н.,
научный руководитель канд.биол.наук Акопова Ю.С
Сибирский федеральный университет

В последнее десятилетие значительно возрос интерес к проблеме ревматических заболеваний у детей [1]. Ювенильные артриты являются одной из самых актуальных проблем в ревматологии, поскольку данная патология сопровождается высоким уровнем инвалидизации пациентов и развитием жизнеугрожающих состояний [2].По распространенности ювенильный ревматоидный артрит занимает первое место среди воспалительных заболеваний суставов. Помимо развития ранней инвалидизации у детей, ювенильный ревматоидный артрит характеризуется вовлечением в процесс жизненно важных органов: сердце, почки, глаза, печень, что придает этому заболеванию исключительную актуальность[3].

Ювенильный ревматоидный артрит (ювенильный идиопатический артрит) – это хроническое системное воспалительное заболевание соединительной ткани с поражением суставов преимущественно по типу прогрессирующего симметрично эрозивно-деструктивного полиартрита, развившееся у детей до16 лет[4].Оно является одним из наиболее частых и тяжелых ревматических форм патологии у детей, которая существенно снижает качество жизни. По результатам различных исследований распространенность ювенильного ревматоидного артрита у детей в разных странах составляет от 0,05% до 0,6% на 100000 детского населения, а первичная заболеваемость от 2 до 19 случаев в год. Распространенность заболевания на территории Российской Федерации составляет 62 человека на 100000, первичная заболеваемость - 16 человек на 100000 детского населения. У подростков распространенность составляет 116 человек. Частота заболевания варьирует в различных этнических группах [5].

Цель данной работы – исследование общего анализа крови у детей с ювенильным ревматоидным артритом.

Материалы и методы

Обследовано 10 детей, больных ювенильным ревматоидным артритом и 6 практически здоровых детей. Венозную кровь обследуемых детей использовали для проведения общеклинического анализа крови на автоматическом гематологическом анализаторе Advia 2120i фирмы Siemens.

Результаты исследования и их обсуждение

Таблица 1.Показатели крови у здоровых и больных детей с ювенильным ревматоидным артритом

Показатель крови	Здоровые n=15	Больные n=16	P
СОЭ, мм/ч	3,00 (2,00;6,00)	7,00 (4,50;22,50)	0,006 P=0,006

Показатель крови	Здоровые n=15	Больные n=16	P
Лимфоциты, 10^9/л	25,00 (22,00;32,00)	40,90 (35,80;46,10)	0,0006 P<0,001
Моноциты, 10^9/л	5,00 (4,00;6,00)	7,25 (5,25; 9,30)	0,008 P=0,008
Нейтрофилы, 10^9/л	52,00 (8,00;58,00)	44,90 (39,10;51,60)	0,015 P=0,015
Гемоглобин, г/л	129,00 (122,00;131,00)	116,00 (110,00;125,00)	0,003 P=0,003
Гематокрит, %	39,30 (36,50;40,10)	36,85 (33,90;38,05)	0,023 P<0,05
Тромбоциты, 10^9/л	267,00 (237,00;292,00)	319,00 (242,00;392,00)	0,04 P<0,05
Средний объем эритроцита, фл	82,90 (80,90;84,10)	78,05 (75,80;79,65)	0,0001 P<0,001

В таблице 1представлены показатели общего анализа крови у здоровых детей и детей, больных ювенильным ревматоидным артритом.У детей, больных ювенильным ревматоидным артритом, достоверно увеличиваются СОЭ($p=0,006$) и количество лейкоцитов (лимфоциты($p<0,001$) и моноциты($p=0,008$)). Значительное увеличение этих показателей связано с воспалительными процессами в суставах и внутренних органах. Достоверно уменьшаются гемоглобин($p=0,003$), гематокрит($p<0,05$) и средний объем эритроцита($p<0,001$). Низкое значение гемоглобина связано с развитием анемии, чаще железодефицитной. В развитии анемии играет изменение метаболизма железа, укорочение жизни эритроцитов. Недостаток железа обусловлен усиленной выработкой печенью гепсидина, который уменьшает всасывание железа в желудочно-кишечном тракте. Уменьшение среднего объема эритроцита связано с железодефицитной анемией. У больных детей также достоверно увеличивается количество тромбоцитов($p<0,05$), что связано с воспалением в организме.

Библиографический список

1. Малиевский, В.А. Эволюция взглядов на диагностические критерии ювенильных артритов / В.А. Малиевский // Медицинский вестник Башкортостана / научно-практический журнал. – Уфа: БГМУ, 2008. - Т.3, № 1. – С. 61

2. Кляритская, И.Л. Ювенильные артриты / И.Л. Кляритская, И.А Иськова // Кримський терапевтический журнал. – Симферополь, 2011. - № 1. – С. 55

3. Беляева, Л.М. Детская кардиология и ревматология: практическое руководство: учебник / Л.М. Беляева; под.ред. Л.М. Беляевой. – Москва: ООО, 2011. – 382-391с.

4. Дмитриева, Л.Т. Влияние физиотерапии на клинические и иммунологические параметры у детей с ювенильным ревматоидным артритом / Л.Т. Дмитриева, Т.Л. Настаушева // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – Т.4, № 22. – С. 67

5. Насонов, Е.Л. Ревматология. Национальное руководство: учебник / под.ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. – Москва: ГЭОТАР – Медиа, 2010. - 687- 693с

УДК 616.61-002.27

ОБЩИЙ АНАЛИЗ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Чеглова О.Н.,
научный руководитель канд.биол.наук Акопова Ю.С
Сибирский федеральный университет

В настоящее время проблема нефрологии является одной из самых социально значимой проблемой в мире. Хроническая почечная недостаточность у детей занимает особое место среди нефрологических заболеваний, поскольку данная патология, в конечном счете, приводит к инвалидизации и смерти. Учитывая высокую степень инвалидизации и значительное снижение качества жизни пациентов, сложность и высокую стоимость терапии больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности, весьма актуальным является предотвращение ее развития у детей[1].

Хроническая почечная недостаточность — симптомокомплекс, развивающийся при хронических двусторонних заболеваниях почек вследствие постепенной необратимой гибели нефронов и характеризующийся нарушением гомеостатической функции почек [2]. Хроническая почечная недостаточность представляет собой конечную стадию любого прогрессирующего заболевания почек в результате уменьшения числа функционирующих нефронов. Это приводит к нарушению экскреторной и инкреторной функции почек, что вызывает изменения гомеостаза человека. По мере снижения скорости клубочковой фильтрации в организме больного хронической болезнью почек постепенно накапливаются продукты белкового метаболизма, существенно перестраивается транспорт ионов калия, фосфора, магния, водорода, что ведет к развитию электролитных сдвигов, нарушению кислотно-основного состояния, ацидозу, гипокальциемии, гиперкалиемии, гиперфосфатемии[3].Частота развития хронической почечной недостаточности у детей увеличивается с возрастом и составляет 3 -50 человек на 1 миллион[4].

Цель данной работы – исследование общего анализа крови у детей с хронической почечной недостаточностью.

Материалы и методы

Обследовано 10 детей, больных хронической почечной недостаточностью и 6 практически здоровых детей. Венозную кровь обследуемых детей использовали для проведения общеклинического анализа крови на автоматическом гематологическом анализаторе Advia 2120i фирмы Siemens.

Результаты исследования и их обсуждение

Таблица 1. Показатели крови у здоровых и больных детей с хронической почечной недостаточностью

Показатель крови	Здоровые n=15	Больные n=16	P
СОЭ, мм/ч	3,00 (2,00;6,00)	10,00 (5,50;33,50)	0,003 P=0,003

Продолжение таблицы 1

Показатель крови	Здоровые n=15	Больные n=16	P
Гемоглобин, г/л	129,00 (122,00;131,00)	116,50 (106,50;122,00)	0,00017 P<0,001
Гематокрит, %	39,30 (36,50;40,10)	35,85 (34,35;38,15)	0,026 P<0,05
Тромбоциты, 10^9/л	294,00 (261,00;355,00)	267,0 (237,00;292,00)	0,045 P<0,05
Эритроциты, 10^{12}/л	4,74 (4,22;4,95)	4,23 (3,95;4,43)	0,008 P=0,008
Моноциты, 10^9/л	5,00 (4,00;6,00)	7,25 (6,85; 9,25)	0,0001 P<0,001
Лимфоциты, 10^9/л	25,00 (22,00;32,00)	39,35 (27,55;44,60)	0,036 P<0,05

В таблице 1 представлены показатели общего анализа крови у здоровых детей и детей, больных хронической почечной недостаточностью. У детей, больных хронической почечной недостаточностью, достоверно увеличиваются скорость оседания эритроцитов($p=0,003$) и количество лейкоцитов (лимфоциты($p<0,05$) и моноциты($p<0,001$)). Значительное увеличение этих показателей связано с воспалительными процессами в организме. Достоверно уменьшаются гемоглобин($p<0,001$), гематокрит($p<0,05$) и количество эритроцитов($p=0,008$). Уменьшение количества эритроцитов связано с нарушением производства эритропоэтина и гемолизом эритроцитов. Разрушение эритроцитов приводит к снижению концентрации гемоглобина и гематокрита. Количество тромбоцитов также достоверно снижается($p<0,05$), что связано с нарушением секреции эритропоэтина.

Библиографический список

1. Игнатова, М.С. Детская нефрология: руководство для врачей: учебник / М.С. Игнатова. - 3-е изд., перераб. и доп. – Москва: МИА, 2011. - 565 - 580с.

2. Сигитова, О.Н. Хроническая болезнь почек и хроническая почечная недостаточность: современные подходы к терминологии, классификации и диагностике/ О.Н. Сигитова // Вестник современной клинической медицины. - Казань, 2008. - Т.1, №1. - С.83-86

3. Барскова, Э.Г. Медико-социальная экспертиза у пациентов с хронической почечной недостаточностью / Э.Г. Барскова, Л.Р. Гинятуллина // Вестник современной клинической медицины. -2012. - Т.5, №3. - С.27

4. Стрелкова, Т.Н. Региональные особенности структуры хронической почечной недостаточности в детской популяции / Т.Н. Стрелкова // Медицинский вестник Башкортостана. - 2012. - Т.7, №3. - С.12

УДК 615.462-036.5

НАПРАВЛЕННАЯ МОДИФИКАЦИЯ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ С ЦЕЛЬЮ УЛУЧШЕНИЯ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ И ПОВЕРХНОСТНЫХ СВОЙСТВ

Чепайкина А.В.
научный руководитель канд. биол. наук Бояндин А.Н.
Сибирский федеральный университет

Использование биосовместимых полимеров имеет большое значение во многих реконструктивных направлениях современной медицины. Особое место среди них занимают полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры гидроксипроизводных жирных кислот микробиологического происхождения (Volova et al., 2004). ПГА используются для разработки шовного материала, стентов, различных тканеинженерных конструкций и раневых покрытий. Однако наиболее доступные представители ПГА, поли-3-гидроксибутират (ПГБ) и сополимер поли-3-гидроксибутират-3-гидроксивалерат (ПГБВ), обладают сравнительно высокой хрупкостью и недостаточной эластичностью, что ограничивает их применение (El-Hadi et al., 2002). Кроме того, использование этих полиэфиров осложняется их гидрофобностью, в ряде случаев препятствующей нормальному взаимодействию с биологическими средами организма и адгезии клеток (Valappil et al., 2006). Возможными путями улучшения физико-механических характеристик и повышения биологической совместимости являются смешение ПГА с другими биосовместимыми полимерами, а также направленная модификация поверхности готовых изделий с целью увеличения ее гидрофильности.

Целями данной работы являлись изменение физико-механических характеристик ПГБ и ПГБВ путем их смешения с синтетическим биосовместимым полимером – поли-ε-капролактоном (ПКЛ), а также повышение гидрофильности поверхности ПГБ за счет ее обработки химическими реагентами.

Материалы и методы

Материалы

Поли-3-гидроксибутират (средневесовая молекулярная масса $M_в$=1015 кДа, полидисперсность ПД=4.14) и поли-3-гидроксибутират-3-гидроксивалерат ($M_в$=701 кДа, ПД=3.27) были получены микробным биосинтезом с использованием штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 (Volova et al., 2014). Поли-ε-капролактон ($M_в$=169 кДа, ПД=1.86) произведен компанией Sigma-Aldrich (США). Хлороформ, NH_3, HNO_3, H_2SO_4, H_2O_2, NaOH, Br_2, этаноламин, триэтиламин, $NaBH_4$ приобретались у различных производителей, с соответствием реагентов классам чистоты «ч.» или «ч.д.а.».

Получение образцов смесей

Для получения смесей ПГА и ПКЛ раздельно растворяли в хлороформе до получения 2%-го раствора (масса/объем). Полученные растворы смешивали в необходимых соотношениях для получения смесей (масса/масса) ПГА:ПКЛ = 9:1 (10% ПКЛ), 3:1 (25%), 1:1 (50%), 1:3 (75%) и 1:9 (90%), и выдерживали в течение трех часов, периодически перемешивая. Полученные смеси двух полимеров, а также растворы чистых полимеров (ПГБ, ПГБВ, ПКЛ) использовали для получения пленок методом испарения растворителя, помещая по 20 мл разогретого до 35°С раствора на предварительно обезжиренные поверхности чашки Петри. Пленки высушивали при комнатной температуре в течение 3-5 суток в беспылевом ламинарном шкафу.

Модификация поверхности ПГБ химическими методами

Для обработки использовались пленки ПГБ, полученные методом испарения из раствора. В первом случае проводилась обработка окислителями (33%-ный раствор H_2O_2), восстановителями (раствор борогидрида натрия в метаноле, 3 г/л) либо гидролитическими агентами (25%-ный раствор NH_3, конц. HNO_3, 1М раствор H_2SO_4, 1М раствор NaOH) в течение 30 минут. Во втором случае пленки последовательно обрабатывались: 1М раствором гидроксида натрия в течение двух часов; бромной водой в течение трех минут; 25%-ным раствором аммиака, триэтиламином или аминоэтанолом в течение получаса, с отмывкой в дистиллированной воде.

Анализ характеристик смесей и обработанных пленок

Для полученных смесей анализировались физико-механические свойства – модуль Юнга, предел прочности, удлинение при разрыве (электромеханическая машина Instron 5565, Великобритания). Для смесей и химически обработанных пленок исследовались микроструктура поверхности (растровый электронный микроскоп TM 3000, Hitachi, Япония) и поверхностные характеристики – свободную поверхностную энергию (СПЭ) и ее полярную составляющую (ПСПЭ) (прибор для измерения краевых углов DSA-25E, Krüss, Германия). Для всех полученных образцов оценивалась биосовместимость по жизнеспособности, прикрепляемости, количеству и морфологии засеянных фибробластов мыши NIH 3T3 в среде DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, стрептомицина и пенициллина при 5%-ном содержании CO_2 в атмосфере и температуре 37°C, с помощью МТТ-теста, растровой электронной микроскопии и флуоресцентного окрашивания ядерной ДНК красителем DAPI.

Результаты и обсуждение

Характеристики пленок на основе смесей ПГА-ПКЛ

При визуальной оценке пленочных образцов выявлены различия, проявлявшиеся в прозрачности пленок, гибкости, различной степени однородности (табл. 1). Данные отличия отмечались для смесей с использованием как ПГБ, так и ПГБВ. С использованием электронной микроскопии показано, что пленки с преобладанием в своем составе ПГА были пористыми, близкими по структуре к пленкам из чистого полимера. Максимальные размеры пор были отмечены для смесей 50/50, причем их размеры менялись в широком диапазоне (1-7 мкм). Пленки с преобладанием ПКЛ были более гладкими и ближе по структуре поверхности к пленкам из чистого ПКЛ.

Свойства поверхности смесовых пленок оценивали по значениям краевых углов смачивания водой и дииодметаном, и рассчитываемой на их основе ПСПЭ, служащей показателем гидрофильности и косвенным показателем биологической совместимости. Небольшое добавление ПКЛ в ПГА (5%) приводило к возрастанию ПСПЭ, которая, однако, снижалась по мере дальнейшего возрастания содержания ПКЛ (10% и 25%). Однако дальнейшее увеличение содержания ПКЛ (50% и 75%) вновь приводило к возрастанию ПСПЭ до уровней, сопоставимых со значением для исходного ПГБВ.

Исследование физико-механических характеристик полученных смесей полимеров показало, что при содержании ПКЛ 75% отмечается возрастание предела прочности на разрыв, модуля Юнга и удлинения на разрыв относительно образцов с наиболее близким соотношением компонентов (ПГА:ПКЛ 50:50 и 10:90). Для пленок с 75%-95% ПКЛ удлинение на разрыв значительно превосходило значения этого показателя не только для ПГБ или ПГБВ, но и для чистого ПКЛ. При содержании ПКЛ 25% отмечено локальное возрастание значения удлинения на разрыв.

Таким образом, несмотря на выявленные отличия структуры поверхности, все полученные пленочные образцы биосовместимы и пригодны для клеточных технологий. При этом наилучшими механическими характеристиками обладают матриксы, полученные из смесей ПГА/ПКЛ в соотношении 25:75.

Структура и свойства полимерных клеточных матриксов с модифицированной поверхностью

Для образования на поверхности полимера функциональных групп в первом случае полимер обрабатывался окислителями, гидролитиками или восстановителями.

Таблица 1. Характеристики пленок, полученных из смесей ПГБВ-ПКЛ

ПКЛ, вес.%	Описание	ПСПЭ, мН/м	Предел прочнос–ти, МПа	Модуль Юнга, МПа	Удлинение при разрыве, %
0	Однородные полупрозрачные	7±0,19	48,20±2,12	3818,70±131,10	1,86±0,02
5	Однородные полупрозрачные	8,3±0,13	46,82±1,27	3427,00±58,70	2,06±0,11
10	Неоднородные, полупрозрачные с матовым	3,6±0,15	24,79±3,42	1723,21±82,41	3,32±0,25
25	Однородные бело-матовые	3,3±0,1	7,42±0,32	381,55±19,23	106,42±17,32
50	Неоднородные, прозрачно-матовые, мелкозернистые	11±0,33	8,19±0,12	387,03±0,22	45,09±6,83
75	Однородные полупрозрачные	9±0,15	16,24±1,10	528,97±2,15	368,51±23,56
90	Однородные полупрозрачные, гибкие	8,4±0,24	13,78±1,81	272,35±21,05	190,16±27,60
95	Однородные полупрозрачные, гибкие	1,8±0,09	13,20±0,33	266,26±5,71	362,32±42,12
100	Полупрозрачные	1,9±0,09	9,42±1,05	238,35±3,56	129,86±12,39

Таблица 2. Результаты измерения краевого угла смачивания и поверхностной энергии полимерных образцов после обработки химическими реагентами

Режим обработки	Краевой угол (вода), град	СПЭ, мН/м	ПСПЭ, мН/м
Чистый ПГБ	91,17±2,19	36,33±0,84	1,59±0,47
NH_3 25% 30 мин	89,80±2,43	36,07±1,25	2,09±0,38
HNO_3 конц. 30 мин	86,62±1,90	36,30±0,63	2,51±0,53
H_2SO_4, 1 моль, 30 мин	88,60±1,20	35,95±0,70	2,36±0,27
H_2O_2, 30 мин	87,16±1,35	38,73±0,77	2,32±0,33
$NaOH/H_2O$, 30 мин	74,43±4,24	42,20±3,41	7,37±1,63
$NaOH/H_2O$, 2 часа	73,10±4,21	43,40±1,72	7,66±1,93
$NaOH/H_2O$, Br/H_2O	76,65±2,04	41,83±1,08	6,00±0,87
$NaOH/H_2O$, Br/H_2O, этаноламин	58,8±3,81	50,16±2,04	15,64±2,61
$NaOH/H_2O$, Br/H_2O, NH_3	67,6±2,27	45,43±1,30	10,54±1,14
$NaOH/H_2O$, Br/H_2O, триэтиламин	78,54±2,13	40,46±1,06	5,45±0,86
$NaBH_4$	88,66±4,53	37,83±1,95	2,13±1,29

Во втором случае, после предварительной обработки щелочью (которая за счет конкурирующих реакций гидролиза и элиминирования гидролизует полимер с образованием смеси 3-гидроксимасляной и кротоновой кислот (Yu et al., 2005), и, таким

образом, ведет к образованию, наряду с гидроксильными и карбоксильными группами, двойных связей), поверхность полимера подвергалась последовательному воздействию бромной воды и – затем – одного из аминосодержащих соединений – аммиака, этаноламина или триэтиламина.

Измерение краевых углов смачивания и расчеты СПЭ показывают изменение данных показателей при большинстве способов химической обработки (табл. 2). Среди гидролитических реагентов наибольшей активностью обладал водный раствор NaOH, обработка которым в течение 30 минут позволила увеличить ПСПЭ с 1,6 мН/м до 7,3 мН/м. Более длительная экспозиция почти не изменяла данные показатели. При воздействии других гидролитических реагентов изменения были значительно слабее. Для H_2SO_4 незначительно увеличивалась только полярная составляющая СПЭ. При обработке концентрированным раствором HCl, напротив, отмечено уменьшение СПЭ до 33 мН/м за счет дисперсной составляющей. Для образцов, обработанных HNO_3 и NH_3, достоверных отличий по сравнению с контролем не выявлено. Достоверное возрастание СПЭ до 38 мН/м было отмечено при обработке раствором H_2O_2 за счет как дисперсной, так и полярной составляющей. Обработка восстановителем борогидридом натрия незначительно влияла на поверхностные свойства образцов.

Более существенные изменения были получены при последовательной обработке водным раствором NaOH, бромной водой и аминосоединениями. Наибольшее возрастание полярной составляющей СПЭ было отмечено при использовании этаноламина и аммиака – до 15,6 мН/м и 10,5 мН/м, соответственно. Это является косвенным подтверждением присоединения аминогрупп на поверхность полимера за счет взаимодействия с бромоалкильными группировками, образующимися на предыдущем этапе при взаимодействии брома с двойными связями остатков кротоновой кислоты, в свою очередь, являющейся продуктом поверхностного гидролиза ПГБ в щелочной среде. В случае с аммиаком, полученные значения существенно контрастируют с показателями, достигнутыми при простой обработке образцов нашатырным спиртом без предварительной подготовки.

Электронная микроскопия не выявила существенных отличий поверхности большинства обработанных образцов от исходных пленок ПГБ. С учетом существенного возрастания значений свободной поверхностной энергии это может свидетельствовать о том, что отмеченные изменения затрагивают лишь незначительный по толщине поверхностный слой пленок, без нарушения их структуры.

МТТ-тест, окраска и электронная микроскопия показали высокую активность, адгезию и нормальную морфологию фибробластов, особенно на пленках, обработанных гидроксидом натрия, бромной водой и аминосоединениями, что подтверждает высокую биосовместимость полученных матриксов.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о пригодности предложенных методов получения смесей ПГА-ПКЛ и поверхностной модификации ПГА для улучшения физико-механических характеристик и биосовместимости полимерных матриксов для тканевой инженерии.

Список литературы

1. El-Hadi A., Schnabel R., Straube E., Müller G., Henning S. Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends // Polymer Testing. – 2002. – V. 21. – P.665-674.

2. Valappil S. P., Misra S. K., Boccaccini A., Roy I. Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and in vivo responses // Expert Review of Medical Devices. – 2006. – V. 3. – № 6. – P. 853-868.

3. Volova T.G. Microbial polyhydroxyalkanoates – plastic materials of the 21st century (biosynthesis, properties, applications). New York: Nova Science Pub. Inc. – 2004. – 283 p.

4. Volova T.G., Kiselev E.G., Vinogradova O.N., Nikolaeva E.D., Chistyakov A.A., Sukovatyi A.G., Shishatskaya E.I. A glucose-utilizing strain, Cupriavidus eutrophus B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs // Plos One. – 2014. – V. 9. – № 2. – e87551.

5. Yu J., Plackett D., Chen L.X.L. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions // Polymer Degradation and Stability. – 2005. – V. 89. – P. 289-299.

УДК 57.085.23

ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИКСЫ С МИНЕРАЛЬНЫМ ПОКРЫТИЕМ ДЛЯ ЗАДАЧ ТКАНЕВОЙИНЖЕНЕРИИ

Чернобровкина Д. А.,
научный руководитель д-р биол. наук Шишацкая Е. И.
Сибирский федеральный университет

Костная ткань обладает высоким потенциалом к регенерации – даже при значительных дефектах при условии сохранения источников регенерации костная ткань способна к самовосстановлению в отличие от большинства других тканей, где в таких случаях дефект заполняется соединительной тканью.Несмотря на эторепаративный потенциал ограничен размером дефекта. Перспективным методом терапии костных дефектов критических размеров является трансплантация клеток в составе тканеинженерных конструкций.

Оптимальным материалом для этой задачи могут стать полимеры семейства полигидроксиалканоатов (ПГА).Удовлетворяя требованиям биосовместимости и биорезорбируемости, предъявляемым к материалам для создания клеточных матриксов, ПГА имеют дополнительные преимущества. В отличие от других материалов, свойства ПГА можно изменять в широких пределах варьированием соотношения мономеров. Механические характеристики и остеоинтегративные свойства полимерных матриксов могут быть улучшены созданием композитов с биокерамическими материалами. Использование для этой задачи гидроксиапатита (ГАП) является решением, максимально приближенным к естественному строению костной ткани.

Целью работы стало конструирование композитных матриксов из полигидроксиалканоатов и гидроксиапатита и исследование их физико-химических и биологических свойств в качествепотенциальных клеточных носителей для тканевой инженерии.

Для исследований методом электростатического формованиябыли получены композитные матриксы из гомополимера 3-гидроксимасляной кислоты (П3ГБ) и ГАП.После этого матриксы экспонировали в растворе, имитирующем солевой состав межтканевой жидкости для формирования биомиметическогокальций-фосфатного покрытия. Раствор готовили по методике Kokubo, согласно которой все концентрации увеличены в 1,5 раза по сравнению со стандартным раствором [1]. Матриксы экспонировали в растворе при температуре 37˚С в течение 14 суток. Для поддержания постоянной концентрации ионов раствор меняли каждые сутки.

Электронная микроскопия показала, что методом электростатического формования были получены цилиндрические волокна с гладкой поверхностью, диаметром до 3 мкм (Рисунок 1). При этом следует отметить, что пористые участки, образованные отдельными волокнами, в некоторых местах сменяются участками с относительно однородной поверхностью, образованными слившимися волокнами.

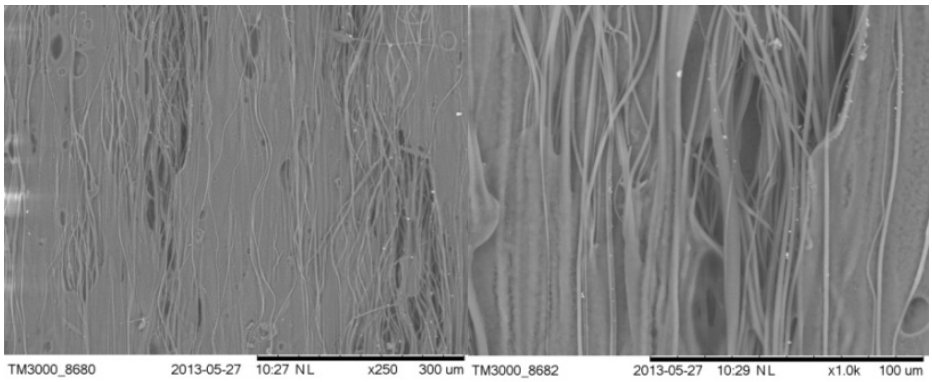


Рисунок 1.Микроструктура нетканого полотна

В ходе экспонирования в растворе, имитирующем солевой состав межтканевой жидкости, на поверхности полимера было сформировано сплошное кальций-фосфатноепокрытие (Рисунок 2). При этом волокнистая структура матрикса прослеживалась отчётливо. Следует отметить, что матриксы из ультратонких волокон наиболее близки к структуре нативной костной ткани, где кристаллы основного минерала ткани - гидроксиапатита - формируются на коллагеновых волокнах.

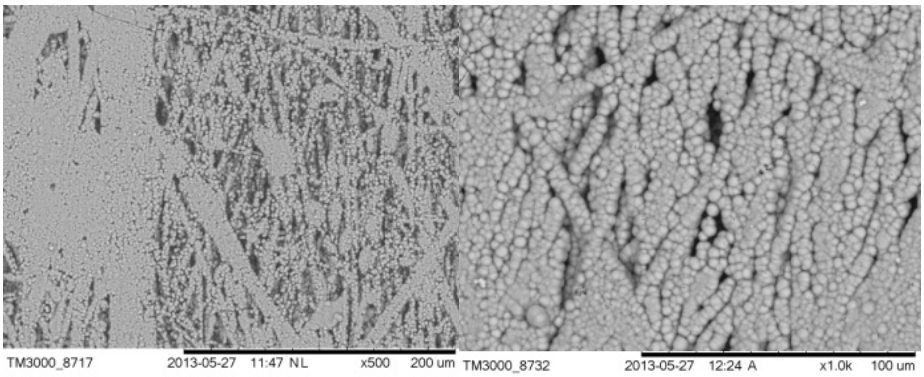


Рисунок 2. Микрофотографии матриксов ПЗГБ+ГАП после экспонирования в SBF

Был исследован состав образованного покрытия (Рисунок 3). В нём присутствовали такие элементы, как кальций, фосфор и магний.

Микрофотография *Энерго-дисперсионный спектр*

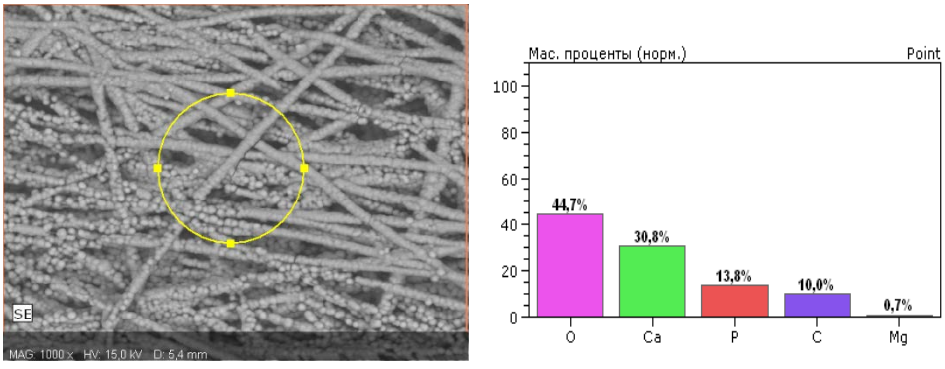


Рисунок 3. Результаты микроанализа образованного покрытия

В рамках исследования была изучена способность матриксов поддерживатьдифференцировку мультипотентныхмезенхимальныхстромальныхклеток (ММСК)в остеогенном направлении.ММСК признаются перспективным клеточным источником в тканевой инженерии. Наряду с такими преимуществами как высокая способность к пролиферации в культуре, возможность получения из широкого спектра тканей, они обладают широкими дифференцировочными потенциями.

Результаты МТТ-теста показывают, что количество метаболически активных клеток на матриксах, имеющих кальций-фосфатное покрытие, достоверно не отличается от количества клеток, на матриксах без покрытия (Рисунок 4). Это говорит об отсутствии цитотоксического эффекта в отношении клеток со стороны покрытия. Замедление темпов пролиферации клеток – количество клеток перестаёт достоверно изменяться, начиная с 14 суток – объясняется остеобластической дифференцировкой клеток. По мере дифференцировки в клетки остеобластического ряда ММСК снижают пролиферативную активность до полной её потери при переходе в остеоциты.

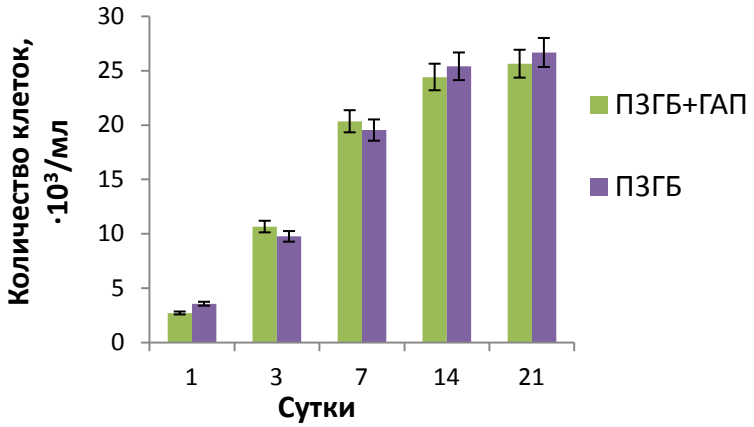
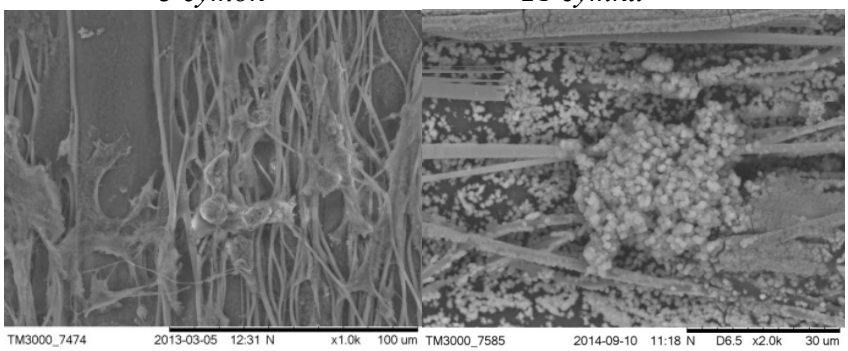


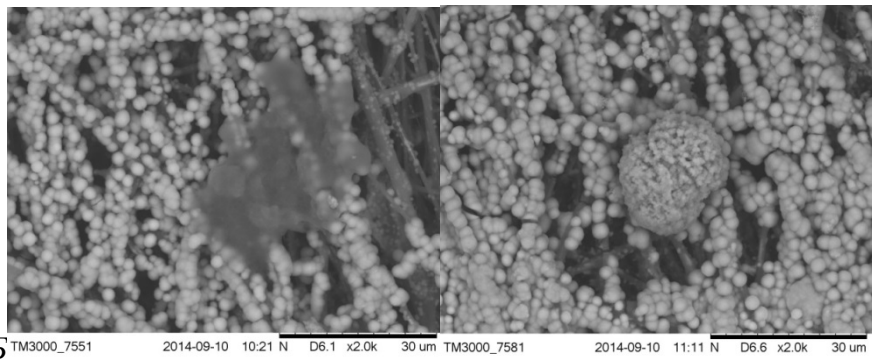
Рисунок 4 - Количество физиологически активных клеток по результатам МТТ-теста

Подтверждением состоявшейся дифференцировки ММСК в клетки остеобластического ряда служит обнаруженное наличие в образцах преципитатов солей. На микрофотографиях видно, что клетки, расположенные на поверхности исследуемых полимерных носителей, на первых этапах культивирования распластаны, имеют отростки. По мере дифференцировки они продуцируют внеклеточные преципитаты солей, которые формируют внеклеточный матрикс и откладываются на поверхности клеток (Рисунок 5).

3 суток *21 сутки*



А



Б

А – ПЗГБ, Б – ПЗГБ + ГАП

Рисунок 5. Микрофотографии остеобластических клеток на разных этапах культивирования

Присутствие кальция и фосфора в составе внеклеточных отложений было подтверждено методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (Рисунок 6). Соотношение кальция и фосфора было близко к 2,4:1.

Микрофотография *Энерго-дисперсионный спектр*

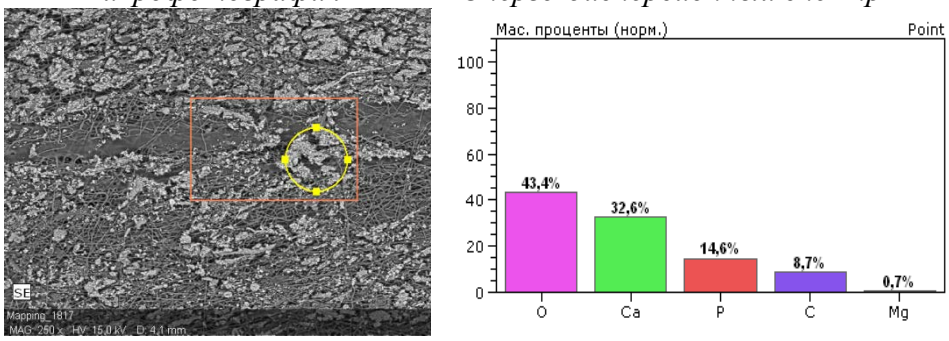


Рисунок 6. Результаты микроанализа клеточных скоплений

Таким образом, культивирование и дифференцировка ММСК на композитных матриксах ПЗГБ+ГАП с кальций-фосфатным покрытием, образованным в результате экспонирования в растворе, имитирующем солевой состав межтканевой жидкости, показало отсутствие токсического эффекта в отношении клеток со стороны покрытия.Состоявшаяся дифференцировка подтверждена продукцией внеклеточных преципитатов кальция.

Список литературы

1. Tanahashi M., Yao T., Kokubo T. et al. Apatite Coating on Organic Polymers by a Biomimetic Process// Journal of the American Ceramic Society. 1994. V. 77. No.11. P. 2805-2808.

УДК 547.326, 615.462, 615.45, 579.61

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ *IN VITRO* АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ДЕПОНИРОВАННЫХ В РЕЗОРБИРУЕМЫЙ ПОЛИМЕРНЫЙ МАТРИКС

Шершнева А.М.
научный руководитель д-р биол.наук, Шишацкая Е.И.
Сибирский федеральный университет

Конструирование долговременных систем доставки лекарственных препаратов относится к числу важнейших направлений современной биотехнологии и фармакологии. Разработка таких систем с регулируемым высвобождением терапевтических агентов позволяет быстро достигать лечебного эффекта и поддерживать уровень требуемой терапевтической концентрации в течение длительного времени, а их использование дает возможность уменьшить курсовую дозу, устранить негативное воздействие и передозировку лекарственных веществ, уменьшить частоту проявлений побочных эффектов.

Целью работы явилась разработка долговременных лекарственных форм антибактериальных препаратов на основе поли-3-гидроксибутирата, и исследование их эффективности действия в отношении бактериальных клеток.

Объектом исследования служил высокоочищенный образец гомополимера 3-гидроксимасляной кислоты (П3ГБ). В качестве лекарственных препаратов были выбраны Доксициклин (РУП «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь) и Цефтриаксон (ЗАО «Лекко», Россия) из-за широкого антибактериального спектра их действия.

Микрочастицы на основе П3ГБ, нагруженные антибиотиками 1, 5 и 10% от массы полимера, были получены эмульсионным методом. Для этого, смешивали 1% раствор полимера с препаратом, растворенным в воде, и обрабатывали ультразвуком Sonicator-S3000 («Misonix Incor.», США) при мощности 9 Вт. После чего полученную эмульсию постепенно добавляли к 0,5% водному раствору поливинилового спирта (Mw 31-50 кДа) при высокоскоростном гомогенизировании (24000 об/мин, «Heidolph» Германия). Далее эмульсию оставляли на сутки при постоянном механическом перемешивании до полного испарения растворителя. По окончанию микрочастицы собирали центрифугированием (10 000 об/мин, в течение 5 мин), промывали дистиллированной водой и лиофильно высушивали («Alpha 1-2 LD plus», Christ®, Нидерланды).

Антибактериальную активность сконструированных П3ГБ микрочастиц определяли с использованием диско-диффузионного метода на колониях клеток *Escherichia coli, Pseudomonas species* и *Staphylococcus aureus.* Данный метод основан на диффузии антибактериального препарата из носителя в плотную питательную среду и ингибировании зоны роста исследуемой культуры [1]. В качестве контроля использовали коммерческие диски антибактериальных препаратов доксициклина и цефтриаксона (с содержанием 30 мкг препарата, «BioRad», Франция), а также коммерческие препараты в дозе, соответствующей содержанию в микрочастицах.

Для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам использовали инокулят, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту McFarland и содержащий порядка $1,5*10^8$ КОЕ/мл. Инокуляцию проводили стерильными ватными тампонами равномерными штриховыми движениями. Спустя 15 минут посередине чашки Петри проделывали лунки диаметром 0,5 мм и раскапывали в них экспериментальные образцы (по 20 мг на лунку) в физиологическом растворе в

объеме, не превышающем 100 мкл. Аппликацию дисков проводили без формирования лунок с помощью стерильного пинцета. По окончанию чашки Петри оставляли в термостате при 37°С. Спустя сутки измеряли диаметр зон задержки роста культуры.

Было проведено две серии экспериментов: в первой была исследована антибактериальная активность микрочастиц, нагруженных цефтриаксоном. Результаты изучения антибактериальной активности обобщены в Таблице 1. Наиболее выраженный антибактериальный эффект разработанных форм был характерен в отношении *E.coli*. Так, для коммерческого диск (концентрация препарата 30 мкг) зона задержки роста *E.coli* составила 37 мм, для *Pseudomonas spp.* – 20 мм и для *S.aureus* – 26 мм (табл. 1).

Таблица 1. Диаметры зон задержки роста культур *E.coli, Pseudomonas spp.* и *S.aureus* в ходе наблюдения

Образец	Диаметр зоны ингибирования, мм				
	E.coli		S.aureus		Pseudomonas spp.
	Цефтриаксон	Доксициклин	Цефтриаксон	Доксициклин	Цефтриаксон
Доступные диапазоны*	29-35*	18-24*	22-28*	23-29*	14-20*
ПЗГБ микрочастицы, ненагруженные препаратом	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
Физиологический раствор	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
Коммерческий диск	37,0	20,0	26,0	28,0	20,0
ПЗГБ микрочастицы, нагружение 1%	32,5	11,5	23,0	24,5	отсутствует
ПЗГБ микрочастицы, нагружение 5%	38,0	14,0	28,0	25,5	26,0
ПЗГБ микрочастицы, нагружение 10%	41,5	15,5	30,0	27	30,0
Свободный препарат, 1%	40,5	26,0	27,5	30,0	28,5
Свободный препарат, 5%	42,0	30,0	29,0	30,0	30,0
Свободный препарат, 10%	43,5	31,5	31,0	31,0	33,5

* Данные приведены из МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания [1].

Несмотря на то, что культуре клеток *E.coli* свойственна выработка *β*-лактамазы расширенного спектра действия, которая инактивирует *β*-лактамные антибиотики, включая цефтриаксон, в отношении данной культуры была зафиксирована эффективная

задержка роста культуры в зависимости от используемой концентрации. Так, с увеличением нагрузки цефтриаксона от 1 до 10% в микрочастицах был характерен рост зон ингибирования колоний от 32,5 до 41,5 мм, соответственно.

При исследовании лекарственной эффективности инкапсулированной формы цефтриаксона в культурах клеток *Pseudomonas spp.* и *S. aureus* также была выявлена тенденция к увеличению зон задержки роста при увеличении концентрации препарата содержащегося в микрочастицах (табл. 1). Стоит отметить, что действие цефтриаксона направлено на ингибирование синтеза клеточной стенки, а именно на разрушение поперечной сшивки пептидогликанов. Однако, несмотря на то, что грамположительные культуры имеют более плотный пептидогликановый слой, в отношении *S.aureus* был отмечен лучший антибактериальный эффект по сравнению с *Pseudomonas spp.*, что скорее всего связано с чувствительностью клеток к данному препарату.

В качестве контроля также была проверена активность ПЗГБ микрочастиц, ненагруженных препаратом, и физиологического раствора, используемого для суспендирования микрочастиц. В обоих случаях ингибирования роста анализируемых культур не наблюдалось.

Таким образом, проведённые исследования в первой серии опытов подтвердили лекарственную эффективность действия разработанных инкапсулированных форм цефтриаксона.

Во второй серии опытов была исследована антибактериальная активность микрочастиц, нагруженных доксициклином в отношении культур *E.coli* и *S.aureus.* Активность инкапсулированной формы доксициклина в отношении *Pseudomonas spp.* не рассматривалась, так как данная культура является устойчивой к воздействию данного антибиотика.

Зона задержки роста в контрольной группе с коммерческим диском для *S.aureus* составила 28 мм, для *E.coli* - 20 мм. В отличие от цефтриаксона механизм действия доксициклина направлен на подавление синтеза белка бактерий. В данном случае наиболее эффективное действие инкапсулированной формы доксициклина было характерно для грамположительных клеток *S.aureus* (табл.1). Стоит отметить, что ингибирующий эффект инкапсулированного доксициклина по отношению к грамотрицательной культуре *E.coli* имел слабый характер во всех выбранных концентрациях. Так, зона задержки роста не превысила 15,5 мм, что ниже допустимого диапазона чувствительности (18-24 мм) согласно МУК 42.1890-04 [1]. При этом свободная форма данного препарата в аналогичной концентрации эффективно ингибировала рост культуры (табл.1).

Таким образом, представленные результаты показали, что с увеличением количества препарата в микрочастицах размер зон ингибирования бактериальных культур возрастал. Это свидетельствует о том, что сконструированные лекарственные формы позволяют антибактериальному препарату эффективно диффундировать в среду. В целом, можно сделать вывод, что разработанные лекарственные формы антибиотиков на основе ПЗГБ обладают хорошей антибактериальной активностью в отношении анализируемых культур, кроме инкапсулированного доксициклина в отношении *E.coli.*

Список литературы

1. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

УДК: 636.045

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КАЛЬЦИВИРОЗА КОШЕК В КРАСНОЯРСКЕ

Щербак Я.И.
научный руководитель: канд. ветеринар. наук Счисленко С.А.
ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет»

В настоящее время в городах с каждым годом увеличивается численность мелких домашних животных. Чаще всего выбор останавливается на кошках. Именно кошки благодаря своей неприхотливости к условиям жизни, часто поселяются в наших домах и квартирах. Человечество с большим уважением относится к этим домашним животным. Так, на Руси с давних времен первой в новый дом входит кошка [4,3].

Но, кошки, как и все живые организмы, болеют заразными заболеваниям, ведущее место среди которых приходится на вирусные, куда относится и кальцивироз. И трудно переоценить те моральные страдание, которые владельцы животного испытывают при его болезни и гибели.

Кальцивироз – высоко контагиозное заболевание, вызываемое вирусом из семейства Caliciviridae. Характеризующиеся поражением слизистой оболочки ротовой полости, верхних дыхательных путей, глаз. Сам вирус достаточно устойчив в объектах внешней среды [2].

Возбудитель передается контактным путем, через предметы ухода за животными, через руки и на одежде хозяина или обслуживающего персонала. Чаще всего данное заболевание регистрируется в питомниках или других местах, где возможно одновременное нахождение большого количества животных.

Целью наших исследований было изучение распространение кальцивироза кошек в г. Красноярске за период с 2012-2014 гг.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на основании изучения статистических данных отчетной документации ветеринарных клиник города Красноярска за 2012-2014 гг. (брали средние статистические данные по районным ветеринарным клиникам), а также результатов лабораторных исследований Краевой ветеринарной лаборатории.

Диагноз на кальцивироз проводят в основном по эпизоотологическим данным, клиническим признакам, а также по лабораторным исследованиям (ПЦР - полимеразная цепная реакция, специфический чувствительный тест для поиска кальцивироза).

Результаты исследований. Как правило, само заболевание начинается с повышения температуры, затем появляются признаки поражения слизистых оболочек глаз (рис.1), язвы по краю языка и на небе (рис.2). Иногда даже воспалительный процесс переходит на конечности (рис.3) [1, 5]. Данную клиническую картину мы наблюдали у семимесячного котенка в ветеринарной клинике ООО «Фауна».

Рис. 1. Поражение глаз

Рис. 2. Язвенные поражения на языке

Рис. 3 .Поражение конечностей

Что касается данных по зараженности кошек кальцивирозом в г. Красноярске, то на основании анализа статистических данных ветеринарной отчетной документации ветеринарных клиник города, а также результатов лабораторных исследований, мы получили следующее.

Само заболевание регистрируется уже более 10-15 лет. В период с 2012-2014 гг., заболеваемость кошек кальцивирозом в 2012 году составила 3,3%. В 2013 немного повысилась до 5,2 %, а в 2014 году процент заболеваемости составил – 4,8%. Динамика заболеваемости кошек за анализируемый период представлен в табл. 1.

Таблица 1.Динамика заболеваемости кошек кальцивирозом

Год исследования		
2012	2013	2014
Заболеваемость (%)	Заболеваемость (%)	Заболеваемость (%)
3,3	5,2	4,8

Вторым этапом нашего исследования стал анализ возрастной восприимчивости кошек к данному заболеванию. Проанализировав возрастную восприимчивость к данному заболеванию, мы пришли к следующему заключению. В г. Красноярске в большей степени болеют молодые животные (до года - в среднем в 60% случаях), чем взрослые (в среднем 40% случаев).

Можно предположить, что любители животных, приобретая котят, часто не спешат их вакцинировать, считая, что они никак не могут заразиться, сидя дома. И не учитывают тот момент, что вирус может попасть в квартиры вместе с обувью и одеждой владельца животного.

Третьим этапом нашего исследования явилось изучение влияния сезонов года на распространение инфекционного заболевания. Нами было отмечено, что набольшее количество случаев заболевания кошек кальцивирозом приходилось на весенне-летний

период (рис.4). (Март-апрель-май - 29,5%. Июнь-июль-август - 26,4% сентябрь-октябрь-ноябрь - 20,7; декабрь-январь-февраль- 23,4%.)

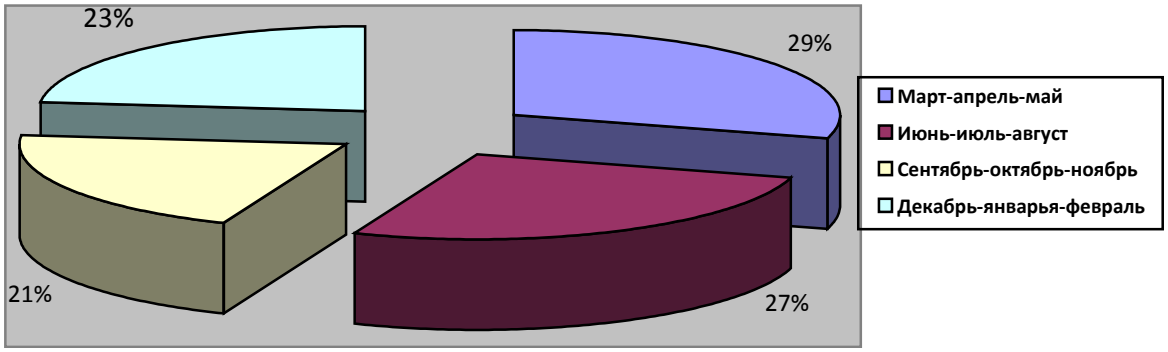


Рис. 4. Регистрация вспышек кальцивироза в зависимости от сезона года

В сложившейся неблагополучной эпизоотической ситуации, по кальцивирозу кошек, надежным средством предотвращения заражения и дальнейшего распространения заболевания – является профилактическая иммунизация. Всех котят необходимо вакцинировать в 8-10 недельном возрасте и повторно через 21-24 дня. Лучше всего использовать вакцину «Мультифел-4» (Москва) или «Нобивак Трикэт (Голландия). Затем ежегодно рекомендуется проводить ревакцинацию.

К сожалению, владельцы домашних питомцев неохотно прибегаю к профилактической защите своих питомцев, что приводит к развитию заболевания, вследствие чего приходится обращаться в ветеринарную клинику уже за лечением.

Само проводимое лечение должно быть направленным на сам вирус и поднятие иммунного статуса организма. С первых дней после появления первых клинических признаков нужно обязательно применять специфическую иммунную сыворотку «Глобфел». Для подавления вторичной микрофлоры лучше применять антибиотики широко спектра действия, для снижения токсичности животному рекомендуется капельное введение физиологического раствора и глюкозы. Для поднятия иммунитета - иммуномодуляторы, например - катазал.

Заключение. Таким образом, на основании полученных данных, мы пришли к выводу, что кальцивироз кошек достаточно широко распространен в городе и регистрируется стабильно на протяжении длительного периода в пределах 3-5 %. Более восприимчивы к этому заболеванию котята до года и у них оно протекает более тяжело. К тому же, всплеск инфекционного заболевания приходится на весенние месяцы (29,5%).

Список литературы

1. Белоусова, Р.В. Ветеринарная вирусология / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова; // под ред. Р.В. Белоусовой. – М.: КолосС, 2007. – 423 с.

2. Домашний ветеринарный справочник для владельцев кошек. – Москва.: Росагропромиздат, 2000. – 276 с.

3. Зелютков, Ю.Г. Инфекционные болезни кошек / Ю.Г. Зелютков, В.А. Машеров, В.В. Петров. // Витебск. «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины. 2003. - 59 с.

4. Старчиков С.В. Болезни мелких животных. – СПб.: Издательство “Лань”, 1999. – 512 с.

5. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина. – М.:ВНИТИБП, 1998. – 928 с.

УДК 615.322

О ВОЗМОЖНОСТИ РАЗРАБОТКИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИЩЕВОГО ПРОДУКТА ДЛЯ ЖЕНСКОГО РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ANGELICA DECURRENS (LEDEB.) FEDTSCH. СИБИРСКОГО РЕГИОНА

Щипицына О.С.
научный руководитель д-р хим. наук Ефремов А.А.
Сибирский федеральный университет

На сегодняшний день не вызывает сомнений то, что одним из факторов, оказывающим существенное влияние на женское репродуктивное здоровье, является питание. Недостаток в ежедневном пищевом рационе таких жизненно важных веществ как клетчатка, жирные кислоты, микроэлементы, важные для кроветворения (кобальт, железо, марганец), а также витамины всех групп, может привести к возникновению широкого спектра заболеваний: от анемии до неспособности зачать и выносить здорового ребенка.

Многие женщиныдля восполнения этого недостатка употребляют различные препараты и БАДы. Большая часть подобныхпродуктов, представленных на российском рынке – иностранная, в состав которых входят разнообразные редкие растительные либо другие компоненты природного происхождения, что определяет их достаточно высокую для российского потребителя стоимость и зачастую сложности в употреблении и понимании их воздействия на организм.При этом среди трав, произрастающих на территории Российской Федерации,естьпризнанные лекарственные растения, не уступающие, а порой и превосходящие иностранные аналоги по комплексу содержащихся в них биологически активных веществ и свойствам, а также такие, изученная биологическая активность и объемы заготовок которых позволят рассматривать их в качестве перспективного промышленного сырья для новых продуктов, в том числе и для женского репродуктивного здоровья.

Одним из таких примеров является растение*Angelica decurrens (Ledeb.) Fedtsch. (Дудник низбегающий)* - зонтичное растение рода *Angelica (Дудники)*, широко распространённое по всему Сибирскому региону. При том, что данный видиспользуетсяс XIX века в народной медицине для лечения женских заболеваний, а также значительном объеме возможного для заготовок сырья и их несложности, на сегодняшний день на данный вид в Российской Федерации нет никакой нормативно-технической документации.

Ближайший же филогенетический родственный вид *Angelica archangelica L. (Дудник лекарственный)*и другие виды рода *Angelica* активно изучаются и признаны во многих странах Европы, США и Канаде растениями-фитокорректорами женского репродуктивного здоровья народной и официнальной медицины. По данным многочисленных иностранных химических и медицинских исследований его вегетативные органы: корни, соцветия, семена и листья в виде порошков, различных экстрактови в составе БАДов, например, «Artemida+», «MenopausalFormula», «Women'sComfortformula», оказывают положительное воздействие на женский организм: противовоспалительное, спазмолитическое, иммуномодулирующее, успокаивающее, стабилизирующее - от обмена веществ до работы эндокринной системы и гормонального баланса. Выделенное в чистом виде эфирное масло корней и семян («AngelicaRootEssentialOil», «AngelicaSeedEssentialOil») способно оказывать аналогичное вышеперечисленному воздействие на женскую репродуктивную систему, а также используется в косметологии для лечения псориаза, кожных раздражений,

ускорения заживление ран, кровоподтеков и рассасывания шрамов.На территории Российской Федерации*Angelicaarchangelica*произрастает в европейской части и также является достаточно известным лекарственным растением и входит в состав и российских БАДов для женщин: «Поморье», «Антиоксифит», «Статус-8», «Ламинарина», «Ангелика форте», «Герба №4-Фитотоник».

Анализ результатов многочисленных исследованийпозволяют заключить, что наиболее ценными в вегетативных органах не только *Angelicaarchangelica*, но и других видов растений рода *Angelica*считаются различные кумариновые соединения, а также компоненты эфирного масла, благодаря которым продукты на основе растений этого рода оказывают такое разнообразное воздействие. Кроме того, в надземной части *Angelicaarchangelica* значительно содержание минеральных элементов: Ca, Mg, Fe, Mn, Zn и Cu, вследствие чего оно рекомендовано для повседневного употребления в пищу.

В ходе нашей предшествующей исследовательской работы в 2010-2014 гг. на территории Сибирского региона (Кемеровской области) были заготовлены, высушены и подготовлены к исследованиям в соответствии с фармакопейными и фармакогнозийными статьями и рядом общей нормативно-технической документации корни, соцветия, семена и листья *Angelica decurrens*.

Из корней, соцветий и семян*Angelica decurrens* разных лет сбора было выделено методом гидропародистилляции цельное эфирное масло синего цвета с ярким ароматом специй и изумрудного с травяными нотами – из соцветий и определен его выход в расчете на абсолютно сухую навеску: из корней – до 0,5%, из соцветий – до 0,6% и из семян – до 2,6%.

Кумариновые соединения из корней, соцветий, листьев и семян *Angelica decurrens* извлекали исчерпывающей экстракцией хлороформом в аппарате Сокслета.

Компонентный состав эфирного масла из корней, соцветий и семян (в листьях эфирное масло не было обнаружено) и хлороформных исчерпывающих экстрактов корней, соцветий, семян и листьев исследовали методом хромато-масс-спектрометрии на газовом хроматографе «AgilentTechnologies 7890A» с с селективным масс-спектрометром (5975 inert MSD/DS StdTurbo EJ) в качестве детектора. Содержание компонентов вычисляли по площадям пиков без применения корректирующих коэффициентов, идентификацию отдельных компонентов проводили сравнением полных масс-спектров с соответствующими данными компонентов эталонных масел и чистых соединений библиотеки данных Wiley.7n и NIST 08, а также с использованием линейных индексов удерживания библиотеки А.В.Ткачева и различных литературных источников. При полном совпадении масс-спектров и линейных индексов удерживания идентификация считалась окончательной.

Было определено более 70 компонентов эфирного масла всех вегетативных органов *Angelica decurrens*, преобладающими компонентамиявляются монотерпеновые соединения: α-пинен и β-фелландрен, а состав масла из различных органов отличается сесквитерпеновыми компонентами, в эфирном масле из корней обнаружен кумарин остол. При сравнении данных о выходе и компонентном составе корневого эфирного масла*Angelica decurrens*и нескольких европейских подвидов *Angelicaarchangelica*сделан вывод о том, что сибирский подвид сопоставим с лекарственным европейским видом по содержанию эфирного масла в корнях, а также что корневое эфирное масло этих видов схоже между собой набором монотерпеновых соединений, а преобладающим в большинстве случаев является монотерпенα-пинен. Кроме того, были определены основные эфирно-масличные структуры корней *Angelica decurrens*– вторичные секреторные каналы – и доказана их идентичность структурам европейского вида *Angelica archangelica.*

В хлороформных исчерпывающих экстрактах различных органов*Angelica decurrens*были идентифицированы с определением времен удерживания и расчетом индексов удерживания кумарины и определено количественное содержание в пересчете на стандарт кумарина остолакумарины: лиметтин иостол;фурокумарины: ангелицин, бергаптен, бьякангелицин, изоимператорин, изопимпинеллин, императорин, ксантотоксин, оксипеуцеданин, оксипеуцеданин гидрат, псорален и феллоптерин. Все эти кумариновые соединения найдены в вегетативных органах и других растений рода *Angelica.*

На сегодняшний день на основании проведенных нами исследований сибирского вида *Angelica decurrens* можно сделать выводы, что:

- за период изучения данного растения с 2010-2014 гг. обзор ареала произрастания и заготовительные работы в Сибирском регионе позволяют утверждать, что из года в год потенциальный объем заготавливаемого растительного сырья остается значительным и подходит для промышленных заготовок;

- данный вид не включен в список растений, содержащие сильнодействующие, наркотические или ядовитые вещества и запрещенных для использования в биологически активных добавках и пищевых продуктах, то есть он подходит для разработки на его основе пищевого продукта;

- компоненты эфирного масла и кумариновые соединения различных вегетативных органов*Angelica decurrens* аналогичныосновным биологически активным веществам всемирно известного европейского вида*Angelica archangelica*, что позволяет предположить и аналогичное воздействие продуктов с данным растением на женский организм.

В связи с вышесказанным мы считаем, что*Angelicadecurrens* - растение Сибирского региона, подходящее для дальнейшего изучения в качестве компонента функционального пищевого продукта для женского репродуктивного здоровья.

Список литературы

1. ShchipitsynaO.S., EfremovA.A.CompositionofEtherealOilIsolatedfromVariousVegetativePartsofAngelicafromtheSiberianRegion // RussianJournalofBioorganicChemistry. 2011. V. 37.№ 7.P. 888-892.
2. Щипицына О.С. Возможность использования сибирского таксона Angelicaarchangelica (Дудника лекарственного) – Angelicadeccurens (Ledeb.) B. Fedtch. (Дудника низбегающего) в качестве растительного сырья для функциональных пищевых продуктов // Мат. III международной интернет-конференция «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии». 2012. С. 312-319.
3. Щипицына О.С., Нарчуганов А.Н., Ефремов А.А. Определение кумаринов и фурокумаринов в различных вегетативных органах Angelicadecurrens (Ledeb.) Fedtsch. методом газовой хромато-масс-спектрометрии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Т.13. №6. С.928-938.
4. Щипицына О.С., Ефремов А.А.Динамика выделения и фракционный состав эфирного масла семян сибирского вида Дудника лекарственного - Дудника низбегающего// Мат. VI всероссийскойконференции «Новые достижения в химии и хим. технологии растительного сырья». 2014.С.207-208.
5. Щипицына О.С., ЕфремовА.А. Особенности накопления эфирного масла в корнях Angelicadecurrens (Ledeb.) Fedtsch. в сравнении с AngelicaarchangelicaL.// Журнал Сибирского федерального университета. Серия «Химия». 2014. Т.7. №4. С. 589-595.