

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



Всероссийская V-я научная конференция

## **Труды секции клинической биохимии**

**23-25 апреля 2013**

Санкт-Петербург  
2013



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

Всероссийская V-я научная конференция  
**«Труды секции клинической  
биохимии»**

Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2013 года

## Бюллетень

*Тематика бюллетеня:*

*Аналитика как инструмент клинической химии*

*Метаболом, пептидом и протеом плазмы крови при  
митохондриальной и эндотелиальной дисфункциях*

*Клинико-биохимическая характеристика нутритивного статуса*

*Метаболические мишени и лекарственный мониторинг*

Санкт-Петербург  
2013

УДК 543/545 (063)

ББК 24.4

А 64

- А 64 **Всероссийская V-я научная конференция «Труды секции клинической биохимии»** (Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2013 г.): бюллетень конференции / Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, 2013. – 84с.

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

Адресовано специалистам в области клинико-биохимических исследований, врачам и студентам медицинских вузов.

***В 2014 году ежегодная конференция в рамках секции «Клиническая биохимия» традиционно состоится в конце апреля.***

***In 2014, the annual conference of the section "Clinical Biochemistry" will be traditionally held in late April.***

*Тексты приведены в редакции авторов без правок оргкомитета конференции*

© Санкт-Петербургский  
государственный  
медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова, 2013



## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Раздел I. Научные труды Отдела биохимии НИЦ СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, опубликованные и принятые в печать в 2012-2013гг.....</b>	<b>7</b>
А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Д.С. Лупан, В.А. Богова, О.А. Кушелева	
АРГИНИН И ЛИЗИН – ПРОДУКТЫ КАРБОКСИПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ФИБРИНОЛИЗОМ.....	8
А.А. Жлоба, Е.Г. Маевская, Н.С. Катышева	
АМИНОКИСЛОТЫ – ИСТОЧНИКИ МЕТИЛМАЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ИНТЕРМЕДИАТОВ ЦИКЛА КРЕБСА У ЛИЦ СТАРШЕГО ВОЗРАСТА.....	21
А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина	
ОЦЕНКА ФРАКЦИИ ОБЩЕГО ГОМОЦИСТЕИНА В СОСТАВЕ КРУПНОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ КРОВИ АССОЦИИРОВАННЫХ С РЕМОДЕЛИРОВАНИЕМ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ.....	31
А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Л.А. Александрова, А.О. Безушко, А.А. Карцова	
КОНТРОЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ ОКСИДА АЗОТА.....	33
Т.Ф. Субботина, А.А. Жлоба, М.А. Кучер, Б.В. Афанасьев	
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В ОЦЕНКЕ НУТРИТИВНОГО СТАТУСА.....	35
Е.С. Алексеевская	
ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА СИСТЕМНЫХ СДВИГОВ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИЯХ.....	37
Е.С. Алексеевская	
ИНФОРМАТИВНОСТЬ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ШИРОКОГО СПЕКТРА МЕТАБОЛИТОВ.....	39
А.А. Жлоба, Е.Г. Маевская	
РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ФОРМИРОВАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА.....	42
Т.Ф. Субботина, В.В. Дорофейков	
ФИБРИНООБРАЗОВАНИЕ И ФИБРИНОЛИЗ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ.....	44
Е.С. Алексеевская	
ВЛИЯНИЕ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА АНАЛИЗА НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛАКТАТА В КРОВИ.....	46

A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, D.S. Lupan, V.A. Bogova, and O.A. Kusheleva	
ARGININE AND LYSINE AS PRODUCTS OF BASIC CARBOXYPEPTIDASE ACTIVITY ASSOCIATED WITH FIBRINOLYSIS.....	48
L.A. Alexandrova, A.A. Zhloba, E.S. Alexeevskaya	
OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH INTRAVASCULAR COAGULATION DISTURBANCE.....	49
A.A. Zhloba	
S-HOMOCYSTEINYLACTION OF THE MACROMOLECULAR PLASMA PROTEINS INCLUDING ALPHA-2-MACROGLOBULIN.....	51
T.F. Subbotina, A.A. Zhloba, E.S. Alekseevskaya	
FIBRINOLYSIS AS A PROCESS OF MODIFYING THE ON-SITE CONCENTRATIONS OF BASIC AMINO ACIDS.....	53
E.S. Alexeevskaya, A.A. Zhloba, T.F. Subbotina	
THE INFLUENCE OF PREANALYTICAL PHASE ANALYSIS TO DETERMINE THE CONCENTRATION OF LACTATE IN THE BLOOD.....	55
A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, E.S. Alexeevskaya, I.A. Rodin, A.N. Stavrianidi, O.A. Shpigun	
SAMPLE PREPARATION WITH AMINOTHIOL DERIVATIZATION FOR METABOLIC CHARACTERIZATION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION.....	57
I. Rodin, O. Shpigun, A. Braun, A. Stavrianidi, A. Zhloba	
LC-MS/MS METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ANAPLEROTIC DYSFUNCTION, METHYLMALONIC ACIDEMIA AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION METABOLIC MARKERS IN HUMAN PLASMA.....	59
<b>Раздел II. Конкурсные научные работы молодых ученых и студентов.....</b>	<b>61</b>
Д.С. Алексеева	
УРОВЕНЬ ТРИМЕТИЛЛИЗИНА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА КАРНИТИНА У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА.....	62
Е.С. Алексеевская	
МЕТАБОЛОМНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ.....	65
Ю.А. Асташова, Е.В. Шилина, О.В. Пищиков	
СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ПРОТЕОМИКИ ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ.....	66
Д.Л. Беляев, М.Л. Куранова, Р.В. Романов	

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ НА КЛЕТКУ.....	70
М.О. Новак, Ю.В. Картышкина	
S-НИТРОЗОТИОЛЫ СЛЮНЫ КАК МАРКЕР ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ.....	71
И.Д. Протасова, А.М. Захарова, И.Л. Гринштейн	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ, ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ И КАРОТИНОИДОВ В ОБЛЕПИХОВОМ МАСЛЕ, ФЛАВАНОИДОВ И ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ В СИРОПЕ ОТ КАШЛЯ МЕТОДОМ ВЭЖХ.....	74
А.В. Соболева, Ю.А. Лебедькова, П.Ю. Морозова, А.А. Колобов	
ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ КУЛЬТУРЫ <i>LACTOBACILLUS</i> <i>PLANTARUM</i> 8РА-3.....	76
С.Е. Фатеева	
ХАРАКТЕРИСТИКА КАТИОННЫХ ФРАКЦИЙ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ СЫВОРОТКИ ЗРЕЛОГО МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА.....	80
В.И. Челов	
МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ.....	81
А.Ф. Янкова	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНСНЫХ ПРЕДЕЛОВ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВЫСШИХ ОКИСЛОВ АЗОТА В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И ПОЛА.....	83

## **Раздел I**

Научные труды Отдела биохимии НИЦ  
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова,  
опубликованные и принятые в печать в 2012-2013гг.



А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Д.С. Лупан, В.А. Богова, О.А. Кушелева  
**АРГИНИН И ЛИЗИН – ПРОДУКТЫ КАРБОКСИПЕПТИДАЗНОЙ  
АКТИВНОСТИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ФИБРИНОЛИЗОМ**  
Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова

*Русскоязычная версия статьи для журнала «Биомедицинская химия», опубликованная в журнале «Biochemistry» (Moscow), Supplement Series B «Biomedical Chemistry» в 2012 году, Vol. 6, No. 3, pp. 261–265. Резюме статьи смотреть ниже, авторы Zhloba A.A., Subbotina T.F., Lupan D.S., Bogova V.A., and Kusheleva O.A. 2012*

Карбоксипептидазы крови являются одним из факторов регуляции фибринолиза. Разработана методика определения ассоциированной с коагуляцией/фибринолизом карбоксипептидазной активности с использованием естественного субстрата – фибрина – и определением продуктов реакции – основных аминокислот лизина и аргинина, в среде, максимально приближенной к условиям *in vivo*. Исследование выполнено на 15 образцах плазмы крови пациентов с артериальной гипертензией. Коагуляцию и последующий фибринолиз в образцах плазмы инициировали добавлением стандартных количеств тромбина и тканевого активатора плазминогена. Концентрации аргинина и лизина до, в процессе и после завершения фибринолиза определяли ВЭЖХ-анализом. Параметры фибринолиза оценивали турбидиметрически.

После завершения цикла коагуляции/фибринолиза отмечено достоверное и весьма значительное увеличение концентраций аргинина и лизина в инкубационной среде, которое составило в среднем 101 и 81% для аргинина и лизина, соответственно. Длительность инициации фибринолиза достоверно коррелирует со степенью прироста этих аминокислот:  $r_s = -0,733$  и  $-0,761$  ( $p < 0,05$ ). Генерация аргинина имеет два максимума – в начале процесса лизиса сгустка и в его конце, тогда как лизин высвобождается преимущественно в середине процесса. Таким образом, возникающая в ходе фибринолиза карбоксипептидазная активность может иметь положительное значение, обеспечивая местную

поставку незаменимых аминокислот, источником которых является деградирующий фибриновый сгусток.

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

**ВВЕДЕНИЕ.** Плазмин – главный фермент системы фибринолиза - является сериновой эндопротеиназой с широкой специфичностью, которая атакует пептидные связи своего естественного субстрата, фибрина, гидролизуя преимущественно связи Арг-Х и Лиз-Х. Таким образом, продукты деградации фибрина плазмином характеризуются большим количеством С-концевых остатков лизина и аргинина. Активация предшественника плазмина – плазминогена - в естественных условиях инициируется в ранний период плазменной коагуляции при появлении первых нитей фибрина. Фибрин обладает участками специфической сорбции плазминогена и его главнейшего активатора – тканевого активатора плазминогена (тАП). Связывание плазминогена происходит по лизиновым остаткам фибрина [1]. По мере начинающегося разрушения фибрина, становятся доступными новые лизиновые остатки, и процесс фибринолиза ускоряется. Считается, что этими дополнительными участками связывания могут быть С-концевые остатки лизина в составе продуктов деградации фибрина [2]. Основные карбоксипептидазы крови, которые отщепляют от белков С-концевые лизин и аргинин, могут, по мнению некоторых исследователей нарушать связывание плазминогена с фибрином и таким образом тормозить фибринолиз. В частности, в крови человека присутствуют несколько ферментов, обладающих подобной активностью [3]. Из них наиболее известны карбоксипептидаза N (СрN, КФ 3.4.17.3) и карбоксипептидаза U (СрU, КФ 3.4.17.20), чаще обозначаемая как активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАFI – thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor). В небольших, но измеряемых количествах

в крови здорового человека также присутствует карбоксипептидаза В тканевого происхождения (CrB, КФ 3.4.17.2); активность этого фермента резко возрастает при остром панкреатите [4]. CrN обладает конститутивной активностью, тогда как CrU присутствует в крови в виде неактивного предшественника, который активируется тромбином, комплексом тромбин-тромбомодулин или плазмином. Чистый тромбин является «плохим» активатором CrU, но в комплексе с тромбомодулином активация усиливается в 1250 раз [5]. CrU отличается крайней нестабильностью и при 37°C утрачивает активность через 10-20 минут [2]. Обычно определяют CrU либо иммуноферментным методом, либо весь имеющийся в образце профермент переводят в активную форму и тестируют с использованием низкомолекулярного синтетического субстрата [6]. Эти методики оценивают концентрацию CrU, но не могут дать представление о его реальном вкладе в ингибирование фибринолиза, которое лежит в основе некоторых тромбофилий. Относительно CrN известно, что эта карбоксипептидаза сохраняет активность в процессе и после завершения фибринолиза; эта активность может быть зарегистрирована с помощью синтетического субстрата. По имеющимся данным, CrN уменьшает связывание плазмينا с фибрином, но не тормозит фибринолиз [7]. В литературе отсутствуют данные о связи между активностью карбоксипептидаз и протеканием фибринолиза, а также сведения о нем, как о процессе, генерирующем существенные количества основных аминокислот.

Нашей целью являлась разработка методики определения ассоциированной с фибринолизом экзопептидазной активности с использованием естественного субстрата – фибрина - и определением продуктов реакции - основных аминокислот лизина и аргинина, - в среде, максимально приближенной к условиям *in vivo*. Принимая во внимание то, что ВЭЖХ анализ, - наиболее точный метод определения аминокислот -

является относительно труднодоступным в клинической лаборатории, мы решили параллельно определить концентрацию аргинина в образцах с помощью реакции Сакагучи.

**МЕТОДИКА.** В работе использованы коммерческие белковые препараты: тромбин человека (ООО «Технология-Стандарт», Барнаул) и тканевой активатор плазминогена (тАП, Actilyse), (Boehringer Ingelheim, Германия). Вероналовый буфер содержал 0,02 М барбитурат натрия (веронал), 0,13 М NaCl и 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH доводили до 7,4 с помощью HCl. Все остальные реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а.

Исследованы образцы бедной тромбоцитами цитратной плазмы крови, полученной из локтевой вены натощак у 15 пациентов с артериальной гипертензией (4 мужчины и 9 женщин, средний возраст 54 года), находящихся под наблюдением в поликлинике № 31 г. Санкт-Петербурга. Исследование проводили в течение 1 часа после забора крови.

*Моделирование фибринолиза.* К 0,3 мл плазмы добавляли 0,5 мкг тАП в объеме 0,05 мл вероналового буфера, и через 1 минуту после этого – 0,05 мл раствора тромбина (0,125 ед. НИН). Образовавшийся фибриновый сгусток инкубировали на водяной бане при 37°C. После завершения лизиса (45 – 120 мин), который регистрировали визуально, среду депротенизировали добавлением 0,4 мл 5% сульфосалициловой кислоты с последующим центрифугированием (4000 g, 20 мин). Контролем служил образец той же плазмы, инкубировавшийся параллельно с 0,05 мл буфера и 0,05 мл тАП. Таким образом, получали образцы для анализа совокупного результата карбоксипептидазной активности, включая активность CrU, за время, превышающее как его «быструю» активацию с участием тромбина и тромбомодулина, так и «медленную» активацию с участием только тромбина. Оценку карбоксипептидазной активности определяли за дискретные промежутки времени или за весь период опыта по приросту концентрации лизина и аргинина. Подобный методический подход, но с

использованием синтетического субстрата [3, 7], позволил выявить в ходе фибринолиза два вида карбоксипептидазной активности – чувствительной к специфическому ингибитору CrU и нечувствительной. С целью оценки кинетики накопления аминокислот, в отдельной серии экспериментов, проведенных на 3 образцах пуловых плазм, через 5-минутные интервалы из инкубационной среды отбирали по 0,02 мл и депротеинизировали равным количеством сульфосалициловой кислоты.

*Определение лизина и аргинина* проводили на хроматографе Agilent методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с дериватизацией орто-фталевым альдегидом на колонке Zorbax Eclipse AAA C18 (200x2,1) мм. После нанесения на колонку 1 мкл супернатанта, проводили элюцию при 40°C в 40 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,8, градиентом ацетонитрила и метанола с УФ-детектированием (338 нм) в соответствии с рекомендациями фирмы Agilent Technologies [8]. Концентрации аминокислот рассчитывали на миллилитр плазмы с использованием введенного в пробу внутреннего стандарта - норвалина. Параллельно в тех же пробах определяли концентрацию аргинина одной из модификаций метода Сакагучи [9].

*Параметры тромбин-индуцированного фибринообразования и фибринолиза, активируемого тАП*, регистрировали турбидиметрическим методом [10] с использованием спектрофотометра СФ2000 на длине волны 340 нм в образце плазмы, разведенной в 20 раз вероналовым буфером. Данный метод позволяет оценить не только суммарное время фибринолиза, но и дифференцировать его, с одной стороны, на лаг-период, когда на кривой оптической плотности наблюдается плато, соответствующее сорбции плазминогена и тАП на фибрине, начальной активации плазминогена и началу деградации фибрина, и, с другой стороны, время наблюдаемого лизиса, которое сопровождается снижением оптической плотности. Продолжительность цикла

коагуляции/фибринолиза согласно данной методике составляет 5-10 минут. Важным параметром является также величина максимальной оптической плотности, которая тесно коррелирует с концентрацией фибриногена в образце.

*Статистическую обработку* проводили методами непараметрической статистики с использованием программы Statistica 7.0. Оценку достоверности различий проводили с помощью критерия Вилкоксона для парных наблюдений. При корреляционном анализе вычисляли ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Критический уровень значимости ( $p$ ) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Из данных, представленных в таблице 1, видно, что почти по всем оцениваемым показателям отмечаются значительные индивидуальные вариации. После завершения цикла коагуляции/фибринолиза отмечается достоверное увеличение концентраций аргинина и лизина в инкубационной среде. Это возрастание регистрируется не только с помощью ВЭЖХ анализа, но и более простой реакцией Сакагучи, причем результаты этих методов достоверно коррелируют между собой ( $r_s=0,697$ ;  $p < 0,05$ ). Увеличение концентраций аминокислот после фибринолиза весьма значительно: по данным ВЭЖХ анализа оно составляет 101 и 81% для аргинина и лизина, соответственно. Определение аргинина методом Сакагучи дает несколько меньший относительный прирост – 62%, хотя все концентрации, определенные этим методом, значительно выше, чем по данным ВЭЖХ. Исходные концентрации аргинина и лизина не коррелируют достоверно с их приростами после завершения лизиса ( $r_s=0,042$  и  $0,383$  для аргинина и лизина, соответственно), что позволяет более уверенно судить о выявленном эффекте как о результате активируемого в ходе фибринолиза ферментативного процесса. В то же время не выявлено ни одной

достоверной корреляции максимальной оптической плотности сгустка, отражающей концентрацию фибриногена, с другими регистрируемыми параметрами.

Таблица 1.

Варьирование параметров фибринолиза и концентраций основных аминокислот в образцах плазмы крови (n = 15)

Название параметра		Среднее и ошибка средней (M±m)	Минимум	Максимум
Лаг-период фибринолиза, с		526 ± 88	174	1452
Время наблюдаемого лизиса, с		560 ± 98	150	1207
Общее время фибринолиза, с		1086 ± 180	324	2659
Максимальная оптическая плотность сгустка, о.е.		0,170 ± 0,015	0,060	0,270
Концентрация аргинина (реакция Сакагучи), мкМ	Контроль	307,6 ± 31,8	160,8	508,8
	После лизиса	496,8 ± 46,9*	220,8	754,0
	Прирост	189,2 ± 37,6	0	593,2
Концентрация аргинина (ВЭЖХ анализ), мкМ	Контроль	94,5 ± 13,7	41,6	217,3
	После лизиса	190,4 ± 54,1*	63,0	792,2
	Прирост	95,8 ± 49,5	2,3	692,1
Концентрация лизина (ВЭЖХ анализ), мкМ	Контроль	116,8 ± 8,3	62,4	160,3
	После лизиса	211,3 ± 36,6*	81,5	609,1
	Прирост	94,5 ± 33,6	19,1	479,4

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

Из параметров фибринолиза, оцениваемых турбидиметрическим методом, тесные и высоко достоверные корреляционные связи с приростом основных аминокислот (но не с их исходными концентрациями) обнаруживаются только для показателя длительности лаг-периода:  $r_s = -0,733$  и  $-0,761$  для аргинина и лизина (p < 0,05). Следует подчеркнуть, что эти связи отрицательные; иными словами, чем быстрее

запускается процесс фибринолиза, то есть длительность лаг-периода меньше, тем выше регистрируемая экзопептидазная активность.

В отдельной серии экспериментов, проведенной на трех образцах пуловых плазм, мы попытались выяснить, каким этапам фибринолиза соответствует наиболее интенсивное образование лизина и аргинина. Данные, приведенные на рис.1 (А, Б), показывают, что скорости высвобождения аминокислот в ходе фибринолиза изменяются по-разному: генерация аргинина имеет два максимума – в начале процесса лизиса сгустка и в его конце, тогда как лизин высвобождается преимущественно в середине процесса – через 30-40 минут после формирования сгустка.

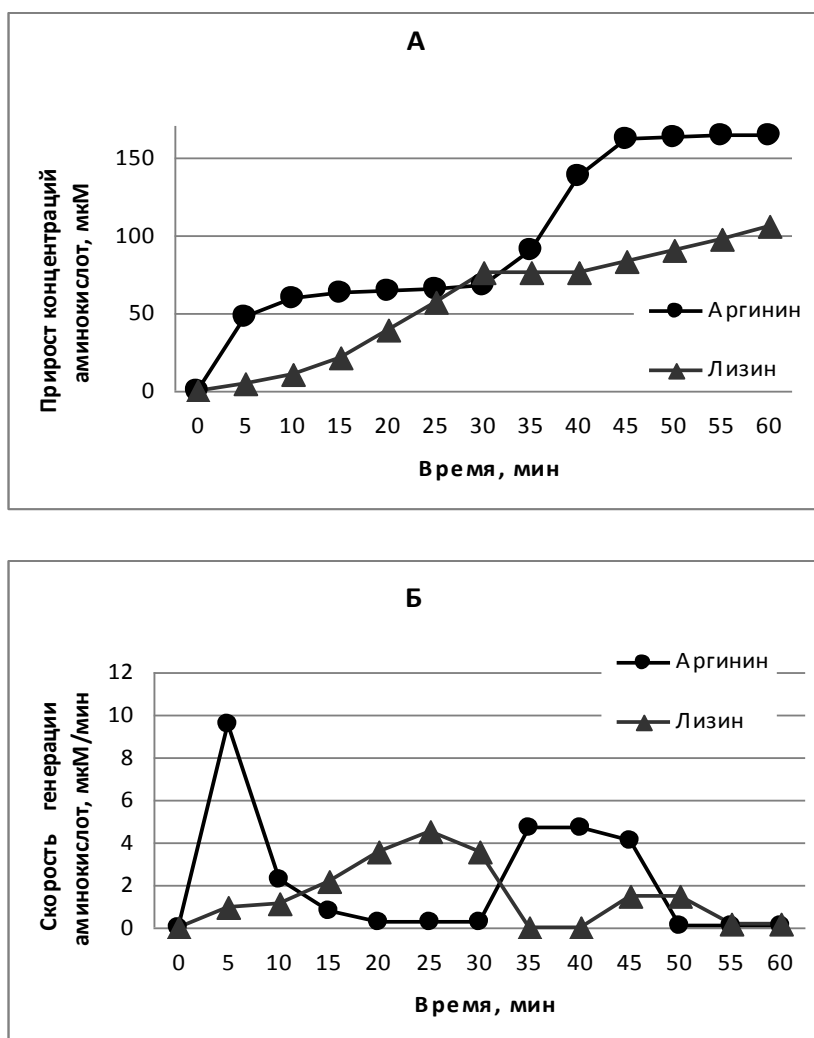


Рис. 1. Динамика (А) и средние скорости (Б) прироста концентраций аргинина и лизина в процессе фибринолиза (n=3)



Наиболее интересным результатом настоящего исследования следует считать регистрацию ассоциированного с фибринолизом освобождения значительных количеств основных аминокислот – аргинина и лизина. Выраженность этого явления достоверно коррелирует с эффективностью начальной фазы фибринолиза. Несмотря на то, что условия модельного эксперимента соответствовали оптимальным для нормального функционирования CrU [3], и использовался тест на карбоксипептидазную активность не с синтетическим, а с эндогенным белковым субстратом, торможения образования продуктов реакции в виде аргинина или лизина, свойственного проявлению активности, CrU [6] не обнаружено. По всей вероятности, эти аминокислоты появляются в результате действия карбоксипептидаз на пептидные субстраты, образующиеся в результате лизиса фибрина плазмином. По направленности выявленного эффекта эта карбоксипептидазная активность не может быть приписана CrU, поскольку в последнем случае корреляции с активностью фибринолиза были бы обратными. Учитывая зарегистрированное нами относительно позднее высвобождение лизина, следует предположить, что активация CrU в данной экспериментальной системе задерживается и происходит тогда, когда удаление С-концевых лизиновых остатков уже не имеет значения для успешного завершения фибринолиза. Можно также думать о том, что CrU-активность, изученная в системах с синтетическим субстратом, не может быть перенесена на активность по отношению к дериватам фибрина. Возможно, в небольшой группе пациентов, обследованных нами, не встретилось таких, у которых активность CrU имела бы существенное патогенетическое значение. Таким образом, короткое плато на кривой оптической плотности в сочетании с выраженным возрастанием концентрации основных аминокислот можно считать достоверным маркером активации фибринолиза, а разработанный нами метод –

пригодным для дальнейшего использования при тестировании суммарной активности карбоксипептидаз, но не индивидуальной активности CrU. Не ясным остается вопрос о более специфичных субстратах для CrU - это фрагменты фибрина или производные основных аминокислот, подобные гиппурил-L-Аргинину? Результаты, полученные с использованием метода Сакагучи, тесно и достоверно коррелируют с данными ВЭЖХ анализа, поэтому более простой метод Сакагучи также можно использовать. При этом следует учитывать его недостатки: для получения надежных результатов необходимо большое количество материала для анализа, кроме того, этот метод всегда дает завышенные результаты. Последнее объясняется недостаточной специфичностью реакции Сакагучи: она положительна не только с аргинином, но и с другими метаболитами, содержащими гуанидиновую группу, а также с аргинином в составе коротких неосаждаемых пептидов. Следует отметить, что средние концентрации аргинина и лизина в контрольных образцах, определенные методом ВЭЖХ, соответствуют референтному интервалу нормы: аргинин 21 – 138 мкМ, лизин 83 – 238 мкМ [11]. Повышение положительно заряженных аминокислот в крови, соответственно приведенным данным, может увеличивать их транспорт не только в эндотелиоциты, но и в макрофаги, где они образуют производные, модулирующие свойства этих клеток. Аргинин и лизин являются предшественниками биологически активных полиаминов, регулирующих дифференцировку макрофагов. Кроме того, из лизина может образовываться промежуточный метаболит – триметиллизин, необходимый для синтеза карнитина. Следует также отметить, что метилирование лизина происходит только после его включения в состав белков, которые в большинстве своем относятся к регуляторным белкам внутриклеточных сигнальных систем. Синтез карнитина в организме существенно ограничен протеолизом этих белков.

Обычно пищевые источники карнитина не вполне удовлетворяют потребности организма в этом переносчике жирных кислот.

Зарегистрированное нами в ходе фибринолиза увеличение концентрации аргинина оказалось значительным, в среднем, примерно двукратным. Это дает основание предположить, что в ходе фибринолиза появляется существенная прибавка субстрата эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Доступность аргинина для eNOS из системного кровотока может быть существенно ограничена [12]. Известно, что аргинин, полученный перорально, обладает вазодилатирующим эффектом при нарушениях кровообращения [13]. Возникновение из аргинина ингибитора этого эффекта известного асимметричного диметил-аргинина (АДМА) происходит не сразу после повышения уровня аргинина. В связи с этим, ингибирующий эффект за счет свободного аргинина не может быть обусловлен накоплением АДМА. Напротив, известно, что лучше всего вазодилатирующий эффект аргинина наблюдается при высоком содержании АДМА. Из работы [13] следует, что вазодилатирующий и другие опосредованные эндотелием реакции за счет добавок аргинина в кровоток существенны у лиц, имеющих исходный высокий уровень АДМА. Для образования АДМА требуется длинный метаболический путь. Сначала в клетках должно произойти включение аргинина в белки, затем - постсинтетическое образование их метилированных производных, затем - их ограниченный протеолиз и лишь затем, после деструктивного протеолиза, могут высвободиться метилированные производные аминокислот. Использование аргинина в качестве субстрата eNOS происходит после его транспорта в область кавеол эндотелиоцитов и может ингибироваться за счет гомоцистеина (и его окисленных форм) [14] или АДМА [12]. Значительное выделение аргинина в ходе фибринолиза, происходящего на поверхности эндотелия, может рассматриваться в качестве дополнительного источника субстрата для eNOS. Таким образом,

активно протекающий фибринолиз, возможно обеспечивает не только лизис тромба, но и может способствовать вазодилатации и восстановлению кровообращения.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Методы определения аргинина и лизина, предложенные в данной работе, использованы для оценки суммарной карбоксипептидазной активности сопутствующей фибринолизу. Эта методика, в отличие от известных методов оценки сопутствующей фибринолизу карбоксипептидазной активности с синтетическими низкомолекулярными субстратами, содержащими одну аминокислоту, основана на использовании в качестве субстрата пептидного материала, нарастающего в модельной системе при фибринолизе. Пополнение заряженными аминокислотами пула плазмы крови положительно коррелировало со скоростью фибринолиза. Контроль за карбоксипептидазной активностью по отношению к временной кривой тромбообразования и лизиса сгустка, позволил выявить отрезки времени, на которых происходит быстрое накопление основных аминокислот, а также потенциал их прироста по отношению к исходному. В работе показано, что в ходе фибринолиза, изученного *in vitro*, могут высвобождаться значительные количества аргинина и лизина.

Предложенная методика оценки суммарной карбоксипептидазной активности пригодна для тестирования генерации дополнительных количеств основных аминокислот в образцах крови при тромболитической терапии.

#### Список литературы

1. Medved L., Nieuwenhuisen W. (2003) Thromb. Haemost., 89(3), 409-419.
2. Bajzar L., Nesheim M., Morser J., Tracy P.B. (1998) J. Biol. Chem., 273(5), 2792–2798.
3. Redlitz A., Tan A.K., Eaton D.L., Plow E.F. (1995) J. Clin. Invest., 96, 2534-2538.
4. Borgström A., Regnér S. (2005) Pancreatology, 5(6):530-536.
5. Mosnier L.O., Bouma B.N. (2006) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 26 (11), 2445-2453.
6. Willemse J.L., Hendriks D.F. (2006) Clin. Chem., 52(1), 30–36.

7. *Plow E.F., Allampallam K., Redlitz A.* (1997) *Trends in Cardiovasc. Med.*, 7(3), 71-75.
8. *Mengerink Y., Kutilán D., Tóth F., Csámpai A., Molnár-Perl I.* (2002) *J. Chromatogr. A*, 949 (1-2), 99–124.
9. *Cerioti G., Spandrio L.* (1957), *J. Biochem.*, 66(4), 603–607.
10. *Субботина Т.Ф., Галебская Л.В.* (2005) *Биомедицинская химия*, 51(1), 60-65.
11. *Туз Н.У.* (1986) *Клиническая оценка лабораторных тестов* (пер. с нем.), Медицина, М.
12. *Жлоба А.А.* (2007) *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* 6(3), 4-14.
13. *Böger R.H.* (2007) *J. Nutr.*, 137(6), 1650S-1655S.
14. *Jin L., Caldwell R.B., Li-Masters T., Caldwell R.W.* (2007) *J Physiol Pharmacol.* 58(2),191-206.

А.А. Жлоба, Е.Г. Маевская, Н.С. Катышева  
**АМИНОКИСЛОТЫ – ИСТОЧНИКИ МЕТИЛМАЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ И  
ИНТЕРМЕДИАТОВ ЦИКЛА КРЕБСА У ЛИЦ СТАРШЕГО ВОЗРАСТА**

Санкт-Петербургский Государственный Университет им. акад. И.П.Павлова  
Отдел биохимии НИЦ, Кафедра клинической лабораторной диагностики

A.A. Zhloba, E.H. Mayevskaya, N.S. Katjisheva  
**THE AMINO ACIDS - SOURCE OF THE METHYLMALONIC ACID AND KREBS  
CYCLE INTERMEDIATES IN THE AGED HUMAN SUBJECTS**

SC Department of Biochemistry, Department of clinical laboratorial diagnostics  
of Saint-Peterburg Pavlov State Medical University

*Статья опубликована в журнале «Клиническая геронтология» в 2012 году:*

*Жлоба А.А., Маевская Е.Г., Катышева Н.С. Метилмалоновая ацидемия и аминокислоты – источник метилмалоновой кислоты и интермедиатов цикла Кребса у лиц старшего возраста // Клиническая геронтология. – 2012. – 18. – №5-6. – С. 35-39.*

**Ключевые слова:** метилмалоновая ацидемия, аминокислотный спектр, метионин, анаплероз, кобаламин

**Резюме.** Показано, что митохондриальная дисфункция у лиц старше 55 лет с гипергомоцистеинемией и метилмалоновой ацидезией сопровождается сниженным уровнем метаболитов ее предшественников, таких как валин, лейцин и повышением метионина. Наблюдаемые системные проявления митохондриальной дисфункции со снижением активности митохондриальной метилмалонил-КоА-мутазы у лиц старшей возрастной группы отличаются от известных метаболических изменений для группы взрослых, которые характеризуются повышением уровня разветвленных аминокислот.

**Key words:** methylmalonic acidemia, spectrum amino acids, methyonine, anaplerosis, cobalamin.

**Abstract.** It was shown that mitochondrial dysfunction in persons after 55 years old with hyperhomocysteinemia and methylmalonic acidemia accompanied with low rate of it metabolic precursors, such as valine, leucine, and elevation of methionine. Observed systemic manifestations of mitochondrial dysfunction with decreased a mitochondrial methylmalonyl CoA-mutase activity in the elderly

patients differ from a known metabolic results for adult groups, which characterized by elevation of the branch chain amino acids.

**Введение.** Один из изученных вариантов вторичной митохондриальной дисфункции (ВМД) у взрослых сопровождается функциональным дефицитом витамина ***B12*** в клетке и ее митохондриях, проявляющийся гипергомоцистеинемией (ГГЦ), метилмалоновой ацидемией (ММА) за счет повышения образования метилмалоновой кислоты (ММК), а также задержкой катаболизма некоторых аминокислот и их накоплением в крови, соответствующим этой задержке [3,10,11,12,15]. Известно, что нарушения в цитоплазме и митохондриях приводят к осложнениям со стороны сердечно-сосудистой и нервной систем. Эти нарушения могут наблюдаться при нормальном содержании витамина ***B12*** в крови [2]. К настоящему времени не изучен вопрос о состоянии плазменного пула аминокислот, а также не вполне ясна роль витамина ***B12*** в формировании ВМД в старшей возрастной группе (>55 лет). Известно, что обычно (у лиц до 50 летнего возраста) при снижении ***B12***-зависимого пути превращения «разветвленных» аминокислот заметно повышается их концентрация в крови [3,15]. Состояние аминокислотного пула – источника субстратов ЦТК у лиц старше 55 лет не изучено при функциональном дефиците витамина ***B12***.

Задачей нашего исследования являлось изучение уровней аминокислот крови, связанных анаплерозом с участием ***B12***-зависимой митохондриальной ММК-мутазы, и количествами образующихся ММК у лиц старше 55 лет. Представлял интерес также уровень глицина, катаболизм которого зависит от митохондриального ***B9***-зависимого процесса, катализируемого глицин-декарбоксилазным комплексом, функция которого весьма чувствительна к состоянию митохондрий [9]. На основе полученных данных представлялось важным формулировка

подхода к нутритивной поддержке при функциональном **B12**-дефицитном состоянии с учетом индивидуального аминокислотного пула.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на базе клиник СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. Критериями для включения образцов в анализ были – возраст старше 55 лет, наличие сердечно-сосудистых заболеваний (Табл. 1) при содержании витамина **B12** в плазме крови в пределах референтных границ нормы от 133 до 675 пМ (тест система Beckman Coulter).

Материалом ретроспективного исследования послужили 9 образцов плазмы крови от пациентов обоего пола. Основные данные, характеризующие пациентов, представлены в табл. 1. У большинства из них, по данным историй болезни уровень систолического/диастолического артериального давления составлял  $139\pm 2,0/89\pm 2,9$  мм рт. ст. Из другой соматической патологии встречались осложнения со стороны функции почек, нарушение толерантности к глюкозе, явления мальабсорбции фолатов, но не витамина **B12**. Отметим также у них невыраженный характер анемии, что не давало ясных указаний к интенсивности фармакотерапии витаминами **B12** и **B9**.

ВЭЖХ- анализом [5], в нашей модификации с использованием хроматографа фирмы Agilent-1100 с флуориметрическим детектированием исследовали ММК в модификации (разрешение на применение модифицированной диагностической технологии: «Лабораторная диагностическая технология выявления метилмалоновой ацидемии», А.А. Жлоба, Е.Г. Маевская, В.В. Никитина, №ФС2010/122, 02.04.10). Спектр аминокислот стандартным ВЭЖХ-анализом с дохроматографическим получением **ОРА**-производных [7] и фотометрическим детектированием (разрешение на применение модифицированной диагностической технологии: «Лабораторная диагностическая технология определения спектра альфа-аминокислот в



плазме крови», авторов А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, №ФС 2010/316 от 31.08.10). Общий гомоцистеин (оГци) анализировали, как описано в работе [16], (разрешение на применение модифицированной диагностической технологии: «Лабораторная диагностическая технология выявления гипергомоцистеинемии», А.А. Жлоба, Э.Л. Блашко, В.В. Никитина, №ФС № 2009/309 от 04.09.09). Уровни витаминов **B12** и фолиевой кислоты определялся методом ИФА - анализа с использованием анализатора Access-2 и наборов фирмы Beckman Coulter.

Статистическая обработка проведена с использованием лицензионной программы SPSS15. Данные выражали в виде средних арифметических и их средних ошибок. Сравнение полученных данных с имеющимися в литературе данными [3,6,14], осуществляли с использованием критериев знаковых рангов Вилкоксона. Корреляционным анализом по Спирмену изучали тесноту связи показателей внутри изученной группы.

**Результаты и их обсуждение.** Согласно данным, представленным в Табл. 1 все пациенты, образцы которых были проанализированы, имели выраженные нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы, и не имели нарушений поступления в организм витамина B12, т.к. уровень последнего во всех случаях был в пределах референтного интервала нормы и составлял в среднем  $248,5 \pm 31,8$  пМ.

Повышенный уровень оГци у этих пациентов –  $13,0 \pm 3,6$  мкМ, при нормальном уровне его от 5 до 12 мкМ [16], свидетельствовал о недостаточной утилизации данного аминокотиола. Это могло зависеть, как от функциональной нехватки витамина **B12**, так и от алиментарной нехватки витамина **B9**, содержание которого составило  $8,9 \pm 0,5$  нМ (Табл. 2). Анализ ММК в этих же образцах показал, что, несмотря на удовлетворительный уровень витамина **B12** в плазме крови, обнаруживается дефицит активности митохондриальной ММК-мутаза. Это состояние оправдывает необходимость анализировать усвоение аминокислот – источников ММК.

В изученном спектре 20 аминокислот наиболее существенные сдвиги были обнаружены в отношении метионина, глицина, изолейцина, лейцина, треонина, валина и цистеина. В аминокислотном спектре плазмы крови большинство этих аминокислот неожиданно оказались достоверно понижены. Содержание их по сравнению с количествами в основной взрослой популяции отражено в Табл. 3. Только уровень метионина был повышен почти в 2 раза, составив  $59,9 \pm 11,7$  мкМ, при снижении уровней других важнейших источников ММК – валина до  $191,3 \pm 14$  мкМ и изолейцина до  $48,7 \pm 7$  мкМ. Несмотря на снижение указанных источников ММК и отсутствие дефицита витамина **B12** в плазме крови, количество ММК было существенно выше нормы, составив –  $2,5 \pm 0,8$  мкМ. Полученные данные указывают на то, что уровень аминокислот, являющихся источниками ММК, у лиц старшей возрастной группы не повышается. Нарастание ММК и торможение данного метаболического пути не влияло на уровень рассматриваемых аминокислот в сторону повышения их количеств в изученных образцах.

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

субстраты, а также белки и нуклеиновые кислоты. Это подтверждает снижение активности пролиферативных и репарационных процессов в данной возрастной группе, возможно, и образование белковых факторов и апоферментов, связанных с митохондриальным метаболизмом витамина **B12**. Корреляционных связей между уровнями ММК с уровнями изученных витаминов в крови не обнаружено. Возможно, что интенсивность изученных митохондриальных процессов в большей степени зависит не от содержания кофакторов, в частности, производного витамина **B12** в виде аденозилкобаламина, а от экспрессии их апобелков, обеспечивающих метаболические пути и транспорт кофакторов в митохондрии. Образование сукцината из ММК является **B12**-зависимой реакцией, катализируемой ММК-мутазой с аденозилкобаламином в качестве кофермента. При нарушении образования активной ММК-мутазы из белка и кофактора развивается ММА. В цитоплазме клетки происходят не менее важные процессы превращения аминокислот с участием кобаламина и фолиевой кислоты. Так при участии метионин-синтазы происходят процессы реметилирования гомоцистеина в метионин.

В отличие от первичной митохондриальной дисфункции, ВМД в меньшей степени связана с энзимопатиями и генетическими мутациями [1]. В группе старше 55 лет, также отмечается дефицит анаплеротического пути от аминокислот к сукцинату, проявляющийся ММА. Анаплеротический путь пополнения митохондриального сукцината при патологических состояниях приобретает огромное значение. Так, например, при нарушении чувствительности к глюкозе в клетках образуется мало пировиноградной кислоты, при этом нарушается образование оксалацетата. В этом случае начинает огромную роль играть анаплеротический путь от аминокислот к сукцинату. При нарушении этого метаболического пути, вследствие нарушения поступления или метаболизма кобаламина, сукцинил-КоА образуется недостаточно, что

способствует торможению усвоения, например, жирных кислот и других источников ацетил-КоА [13]. Вторично, как указано ранее, ожидается повышение концентрации аминокислот - источников ММК. Как показано в настоящей работе эта закономерность не соблюдается в группе обследованных старше 55 лет. Нами выявлена ММА при нормальном содержании витамина **B12**, что свидетельствует о формирующейся ВМД у лиц данной группы, несмотря на удовлетворительный уровень указанного источника кофермента. Данный вид ВМД характерен для лиц старшей возрастной группы, так как ММА у них развивается на фоне пониженного содержания анаплеротических источников интермедиатов ЦТК. Этот тип ВМД, по видимому, в большей степени зависит не от дефицита витамина **B12**, а от снижения экспрессии ферментов анаплеротического пути, включая **B12**-зависимую ММК-мутазу.

В связи со сделанным нами выводом, коррекция ММА у лиц старшей возрастной группы повышением доз витамина **B12** в виде цианкобаламина – не может быть эффективна. В данных случаях необходима коррекция нарушенного баланса аминокислот в сочетании с фармакотерапией субстанциями витамина **B12** и одновременной коррекцией ГГЦ повышенными дозами фолатов. При пониженной концентрации валина, изолейцина и достаточно высоком содержании метионина у лиц старшей возрастной группы основным источником ММК является метионин. Избыточное поступление метионина в организм следует признать в рассмотренной группе не оправданным, так как у них это приводит к усилению ГГЦ.

**Вывод.** В отличие от лиц более молодого возраста, у которых при ММА, повышена концентрация аминокислот, у лиц старшей возрастной группы наблюдается понижение концентрации этих аминокислот при ММА. Выявление данного изменения спектра аминокислот у лиц пожилого возраста с ВМД имеет большое значение для планирования

коррекции терапии и назначения нутритивной поддержки. Последнюю можно адекватно обеспечить при условии понимания общего торможения белок синтезирующей системы у лиц старшей возрастной группы. У них наблюдается неэффективное усвоение незаменимых аминокислот и их использование для образования белковых факторов, включая факторы транспорта витамина **B12** в клетку, и синтеза его коферментной формы в митохондриях. Возможно нутритивная поддержка, включающая как препараты богатые разветвленными аминокислотами, так и витамином **B12** в форме аденозил-кобаламина (Cobamamidum) или гидроксикобаламина, у этих пациентов более целесообразна, чем использование других лекарственных форм витамина **B12** не соответствующих коферменту ММК-мутаза.

#### Список литературы

1. Вельтищев Ю.Е., Темин П.А., Белоусова Е.Д. Наследственные болезни нервной системы. М.: Медицина, 1998. С. 409-454.
2. Светлицкая С.Г. Мегалобластические анемии // Медицина. 2004. №1. С. 30-32.
3. Тиц Н.У. Клиническая оценка лабораторных тестов. М.: Медицина, 1986. С. 41-57.
4. Allen R. H., Stabler S.P., Savage D.G. et al. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency// Faseb J. 1993. V.7. P. 1344–1353.
5. Babidge P.J., Babidge W.J. Determination of methylmalonic acid by high-performance liquid chromatography// Anal. Biochem. 1994. V. 216. P. 424–426.
6. Gitlitz P.H., Sunderman F.W., Hohnadel D.C. Ion-exchange chromatography of amino acids in sweat collected from healthy subjects during sauna bathing// Cli. Chem. 1974. V. 20. P. 1305 - 1312.
7. Gratzfeld-Huesgen A. Sensitive and reliable amino acid analysis in protein hydrolysate using the HP 1100C series HPLC// Agilent technical note. 1998.
8. Heil S.G., Lievers K.J.A., Boers G.H. and al. Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT): Genomic sequencing and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans// Mol. Genet. Metab. 2000. V.71. P. 511–519.
9. Lamers Y., Williamson J., Gilbert L. R. Glycine turnover and decarboxylation rate quantified in healthy men and women using// J. Nutr. 2007. V. 137. P. 2647-2652.
10. Makings E.V., Chetty N., Reavis S.C. and Metz J. Methylmalonic acid metabolism and nervous system fatty acid in Cob-deficient fruit bats receiving supplements of methionine, valine and isoleucine// J. Biochem. 1991. V. 275. P. 585-590.
11. Oberholzer V.G., Levin B., Burgess E.A., Young W.F. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis// Arch. Dis. Child. 1967. V. 42. P. 492 – 504.

12. Ostergaard E., Hansen F.J., Sorensen N. and al. Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations// Brain. 2007. Vol.130. P. 853-861.
13. Owen O.E., Kalhan S.C., Hanson R.W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function// J. Biol. Chem. 2002. V. 277. №34. P. 30409–30412.
14. Polge A., Bancel E., Bellex H. and al. Plasma amino acid concentrations in elderly patients with protein energy malnutrition//Age Ageing. 1997. V.26. P.457-462.
15. Shah S.H., Bain J. R., Michael J. Muehlbauer et al. Association of peripheral blood metabolic profile with coronary artery disease and risk of subsequent cardiovascular events// Circ. Cardiovasc. Genet. 2010. V. 3. P. 207 – 214.
16. Zhloba A.A., Blashko E.L. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection// J. Chromatogr. B. 2004. V. 800. P. 275-280.

Источники финансирования работы: выполняется в рамках плана НИР ГОУ ВПО СПбГМУ им. И.П.Павлова.

**Таблица 1**

**Характеристика группы пациентов (n=9)**

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

Таблица 2

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

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

Таблица 3

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

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

\*-означает достоверное повышение, а ^- понижение, при  $p < 0,05$  при равнении с данными работы [6].

А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина  
**ОЦЕНКА ФРАКЦИИ ОБЩЕГО ГОМОЦИСТЕИНА В СОСТАВЕ  
КРУПНОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ КРОВИ АССОЦИИРОВАННЫХ С  
РЕМОДЕЛИРОВАНИЕМ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ**

Отдел биохимии НИЦ СПбГМУ им. И.П. Павлова  
Институт молекулярной биологии и генетики Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии  
имени В.А. Алмазова

*Тезисы статьи, принятой к печати в журнал «Артериальная гипертензия» в 2013 году*

Повышение содержания гомоцистеина (Гци) в тканях вызывает цитотоксические эффекты. Повышение суммарного содержания различных фракций Гци в крови выше 12 мкМ принято называть гипергомоцистеинемией (ГГЦ). Термин "общий гомоцистеин" плазмы крови (oГци, tHcy) обозначает сумму концентраций аминотиола в восстановленной (-SH) и окисленных (-S-S-) формах. Предполагают, что S- и, частично, N-гомоцистеинилирование белков играет основную роль в токсических эффектах Гци. Соотношения свободного к связанному с белком аминотиолу составляют 0,2 для Гци, около 0,5-0,6, для цистеина и 4-5 для Глт, таким образом, за счет образования дисульфидных связей Гци прочнее других аминотиолов связывается с белками. Ранее при помощи гельфильтрации было показано, что этот аминотиол при патологических состояниях может транспортироваться в составе альфа-2-макроглобулина. Гомоцистеинилированием апопротеина В в составе липопротеидов может также объясняться перенос больших количеств Гци в клетки сосудистой стенки, включая эндотелиоциты.

Показатель oГци не вполне удовлетворяет своей информативностью при проспективной оценке патологического процесса в области сосудистой стенки.

В работе предложена методика оценки фракции oГци с помощью ультрафильтрации, позволяющей отсеять фракцию белков выше 300 КД. Тест оценки фильтруемости Гци пригоден для использования в практике диагностической лаборатории, выполняющей определение oГци любым



мтодом. В частности, фильтруемость Гци может зависеть от трансформации альфа-2-макроглобулина после присоединения активированной эндогенной протеиназы- участницы различных систем регуляции кровообращения за счет коагуляции-фибринолиза, регуляции сосудистого тонуса и с участием секретируемых в кровь протеиназ. Из неферментативных белковых переносчиков Гци, содержащихся во фракции с молекулярной массой  $>300$  КД значение имеет белок апоВ.

Оценка нефилтруемой фракции оГци при помощи центрифужных устройств Vivaspin 300000 MWCO PES «Sartorius» дает информацию о транспорте Гци по дополнительному пути не в клетки печени и почек с альбумином, а, например, в макрофаги эндотелиоциты, гладкомышечные клетки и другие клетки, экспрессирующие рецептор к альфа-2-макроглобулину или апоВ-содержащим липопротеидам. Доля связанного этими белками Гци варьирует в широких пределах от 30 до 98% вне зависимости от уровня оГци.

А.А. Жлоба<sup>1</sup>, Т.Ф. Субботина<sup>1</sup>, Л.А. Александрова<sup>1</sup>,  
А.О. Безушко<sup>2</sup>, А.А. Карцова<sup>2</sup>

### КОНТРОЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ ОКСИДА АЗОТА

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный медицинский университет, Отдел биохимии НИЦ

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Кафедра органической химии

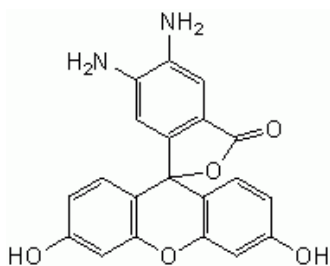
[Zhloba@mail.spbnit.ru](mailto:Zhloba@mail.spbnit.ru)

*Тезисы доклада на XVIII Всероссийской научно-практической конференции «Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторной медицины», Москва, 26-28 марта 2013*

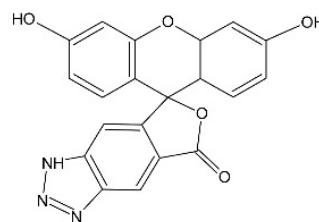
Исследование уровня оксида азота и нитрозотиолов в крови (Номенклатура медицинских услуг, А09.05.217) имеет диагностическое значение и отражает активность патологического процесса, в частности, при соединительнотканых заболеваниях. Вазоактивные продукты, включая *NO* и нитрозотиолы, в качестве объектов лабораторной диагностики признаны более информативными, чем высшие окислы азота. В связи с тем, что эти вещества нестабильны, проблема внедрения методов их оценки, разработка калибраторов и стандартов, а также методики контроля качества для этого лабораторного теста, остается актуальной.

В работе проведена оценка аналитических параметров методики определения *NO* и нитрозотиолов. Для этого использована калибровка стабильными растворами *DAF-2-T*, являющегося флюоресцирующим продуктом взаимодействия *DAF-2* и *NO*.

**Материалы и методы.** Для работы использована ЭДТА-плазма 80 здоровых доноров в возрасте от 30 до 61 года. В качестве ловушки оксида азота использовали *DAF-2*.



**DAF-2**



**DAF-2T**

**Результаты и обсуждение.** Предложена методика автоматизированного приготовления реакционной смеси с использованием аутосамплера “*Agilent 1100*” (Германия) с последующей флюориметрической регистрацией. Референтный уровень оксида азота в плазме здоровых доноров составил: медиана, (25-75 перцентиль)= 0,83, (0,54– 1,24) мкмоль/л плазмы. В ходе исследования показано, что продукт DAF-2T в отличие от свободного оксида азота и его нитрозотиола отличается стабильностью и пригоден для калибровки методов определения NO. Для генерации свободного оксида азота могут быть использованы растворы нитрозоглутатиона, который после декомпозиции ультрафиолетом, образует продукт взаимодействующий с **DAF-2**. Методика получения нитрозоглутатиона и его декомпозиции в среде **DAF-2** может быть использована для калибровки анализа и в качестве референтной методики для оценки лабораторных тестов определения оксида азота в различных образцах.

Т.Ф. Субботина<sup>1,2</sup>, А.А. Жлоба<sup>1,2</sup>, М.А. Кучер<sup>1</sup>, Б.В. Афанасьев<sup>1</sup>  
**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В  
ОЦЕНКЕ НУТРИТИВНОГО СТАТУСА**

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова  
Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова

*Тезисы доклада на XVIII Всероссийской научно-практической конференции «Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторной медицины», Москва, 26-28 марта 2013*

**Введение.** Актуальность оценки нутритивного статуса (НС) возрастает в связи с усовершенствованием методов курации пациентов с тяжелыми соматическими патологиями. Из лабораторных методов оценки НС наибольший интерес представляют методы ранней диагностики его нарушений, а также методы, обладающие специфичностью в отношении дефицитных компонентов. Определение профиля аминокислот (АК) плазмы крови является весьма перспективным, однако трудным в интерпретации методом, что связано с широкой межиндивидуальной биологической вариабельностью концентраций отдельных АК.

**Цель.** Сопоставить АК спектры в однородной группе пациентов с результатами оценки НС рутинными методами. Оценить влияние полихимиотерапии (ПХТ) на АК профиль плазмы.

**Материалы и методы.** Исследованы 22 образца взятой натощак плазмы крови пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) (все – женщины 18-55 лет, средний возраст 33 года, у 80% фаза прогрессии). Каждого пациента исследовали дважды с интервалом в 1 неделю, в течение которой проводили курс ПХТ с целью кондиционирования для последующей трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. АК плазмы крови оценивали ВЭЖХ-анализом согласно зарегистрированной нами лабораторной диагностической технологии № ФС 2010/316 от 31.08.10. Достоверность индивидуальных сдвигов в концентрациях АК оценивали с помощью известных из литературы значений RCV% для каждой АК. В комплекс рутинных методов оценки НС входили: общий белок и альбумин плазмы, мочевины крови и мочи, а также

антропометрические данные. **Результаты.** У пациентов с ОМЛ, даже в состоянии эутрофии наблюдается дисбаланс АК, выражающийся чаще всего в снижении концентраций аланина, глутамина, дефиците одной или нескольких незаменимых АК. Индивидуальная динамика АК профиля позволяет оценить степень и направленность негативного воздействия ПХТ на НС: активизацию катаболизма белков, развитие фолиевого, В12- или В6- дефицитов.

**Выводы.** Определение АК спектра плазмы крови у пациентов с ОМЛ является методом ранней диагностики нарушений НС на фоне снижения фолиево-зависимого метаболизма. Использование этого метода наиболее целесообразно не в популяционных, а в индивидуальных динамических наблюдениях.

Е.С. Алексеевская  
**ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА СИСТЕМНЫХ СДВИГОВ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ  
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИЯХ**  
Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова  
Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

*Тезисы доклада на XVIII Всероссийской научно-практической конференции «Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторной медицины», Москва, 26-28 марта 2013*

**Цель работы** – оценка показателей митохондриальной (МД) и эндотелиальной (ЭД) дисфункций у пациентов с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза.

**Материалы и методы:** Были исследованы образцы плазмы крови пациентов ( $n=34$ , от 50 до 83 лет) с уровнем *D*-димера выше 500 нг/мл и здоровых доноров ( $n=20$ , от 55 до 61 года). В образцах определяли концентрацию цитохрома *C* (*CytC*), молочной кислоты (*LA*), общего гомоцистеина (*tHcy*) и спектр аминокислот (*AA*). Статистическая обработка данных включала оценку закона распределения, описательную статистику (данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха), сравнительный (критерий Манна-Уитни) и корреляционный (критерий Спирмена) анализы.

**Результаты и их обсуждение:** В группе пациентов исследуемые показатели составили: *CytC* 77(28-285) нг/л, *LA* 3,0(2,3-4,1) ммоль/л, *tHcy* 13(9-19) мкмоль/л, *Ala* 538(431-705), *Gly* 298(203-365), *Ile* 104(90-124), *Leu* 179(145-202), *Val* 203(178-248) мкмоль/л; в группе доноров: *CytC* 86(50-131) нг/л, *tHcy* 11(8-12) мкмоль/л. Уровень *tHcy* у пациентов был достоверно выше, чем у доноров, а значения *CytC* между группами не различались. Значения медиан концентраций *Ala*, *Ile* и *Leu* в группе пациентов превышали 75 перцентиль соответствующих референтных интервалов. У 30 % пациентов отношение концентраций *Ala*/(*Phe*+*Tyr*) составило более 4, что свидетельствует об истинной гипераланинемии, характерной для МД. Наличие достоверной положительной связи между концентрацией *CytC* и уровнями *Ile* и *Gly* в группе пациентов ( $r=0,41$  и

$r=0,42$  соответственно) подтверждает не случайность наблюдаемых сдвигов. Как известно катаболизм этих АА осуществляется с участием митохондриальных ферментов. Таким образом, МД имела место в группе пациентов, причем уровень *CytC* в этой группе также был связан с концентрацией *tHcy* ( $r=0,49$ ;  $p=0,03$ ).

**Выводы:** Таким образом, МД и ЭД в изученной группе развиваются взаимосвязано и ассоциированы с возрастом. Для диагностики МД и ЭД наиболее перспективным является метаболомно-протеомный подход – анализ широкого спектра показателей. В этом случае даже незначительные, но однонаправленные сдвиги в биохимическом профиле у конкретного пациента позволяют судить о развитии патологического процесса.

Е.С. Алексеевская  
**ИНФОРМАТИВНОСТЬ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ШИРОКОГО  
СПЕКТРА МЕТАБОЛИТОВ**

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

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова  
Отдел биохимии Научно-исследовательского центра

*Тезисы, принятые к публикации в сборнике материалов Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященной 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова, Ярославль, 24-26 апреля 2013*

**Актуальность:** Современное молекулярно-биологическое исследование характеризуется оценкой свойств биологического объекта на геномном, транскриптомном, протеомном и метаболомном уровнях. Оценка метаболома, при этом, является логическим завершением исследований и наиболее информативной характеристикой фенотипа.

**Целью** данной работы явилась оценка информативности комплексного определения широкого спектра метаболитов.

**Материалы и методы:** Были исследованы образцы плазмы крови пациентов ( $n=34$ , от 50 до 83 лет) с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза (уровень *D*-димера выше 500 нг/мл) и здоровых доноров ( $n=20$ , от 55 до 61 года). Методом ВЭЖХ-анализа были определены концентрация общего гомоцистеина (*tHcy*) и спектр аминокислот (*AA*). Продукцию оксида азота (*NO*) определяли по содержанию его нитрозотиолов и активных метаболитов (*NT*) и суммы нитратов и нитритов (*NOX*). Активность супероксиддисмутазы (*SOD*) была определена в ходе реакции окисления кверцетина, а концентрация *SH*-групп – методом Элмана. Цитохром *C* (*CytC*) определяли методом ИФА (eBioscience, Austria). Статистическая обработка данных (*SPSS 16.0*) включала оценку закона распределения, описательную статистику (данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха), сравнительный (критерий Манна-Уитни), корреляционный (критерий Спирмена) и факторный анализ. Уровень значимости принят  $p<0,05$ .



**Результаты и их обсуждение:** В группе пациентов уровень *tHcy* составил 13(9-19) мкмоль/л и превысил у 20 пациентов верхнюю границу референтного интервала в 12 мкмоль/л. Концентрации *NT* и *SH*-групп у пациентов составили соответственно 562(288-943) нмоль/л и 43(34-61) мкмоль/л и были достоверно ниже, чем у здоровых доноров – 958(672-2663) и 86(72-97) соответственно. Уровень *NOX* в 43(26-55) мкмоль/л, напротив, был выше у пациентов, чем у доноров – 21(17-25). Активность *SOD* и уровни *CytC* в группах не различались. Одновременно с этим в спектрах *AA* ряда пациентов наблюдалось повышение относительно референтных интервалов уровней *Ala*, *Gln*, *Glu*, *His*, *Ile*, *Leu*, *Lys*, *Met*, *Trp*, *Tyr*, *Val* и снижение концентрации *Ser*. Между концентрацией *CytC* и уровнями *Ile* и *Gly* в группе пациентов имелась достоверная положительная связь средней силы ( $r=0,41$  и  $r=0,42$  соответственно). Как известно катаболизм этих *AA* осуществляется с участием митохондриальных ферментов. С учетом того, что концентрация молочной кислоты в группе пациентов составила 3,0(2,3-4,1) ммоль/л, митохондриальная дисфункция (МД) имела место. В ходе факторного анализа было выделено три фактора (*Fact*). К *Fact1* относились только все *AA* за исключением *Ser* и *Gly*. В *Fact2* вошли *SOD* и *SH*-группы, но не *NT*. К *Fact3* относились *tHcy*, *CytC*, *NOX*, *Gly* и *Ser*, причем, только *Ser* имел отрицательную факторную нагрузку. Превращение *Ser* в *Gly* является важной реакцией для образования активной формы тетрагидрофолиевой кислоты. Этот кофермент необходим для обмена *tHcy*, который является известным фактором эндотелиальной дисфункции (ЭД). Мы интерпретируем *Fact3* как параметр сочетанного проявления МД и ЭД.

**Выводы:** Проведенный статистический анализ данных позволил получить диагностически значимую информацию в условиях однонаправленных отклонений исследуемых величин в пределах одного

фактора, даже когда значения показателей находились в диапазоне референтного интервала.

А.А. Жлоба, Е.Г. Маевская  
**РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ФОРМИРОВАНИИ  
МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

Санкт-Петербургский Государственный медицинский Университет им. акад. И.П.Павлова  
Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Санкт-Петербург, Россия  
[Zhloba@mail.spbnit.ru](mailto:Zhloba@mail.spbnit.ru)

*Тезисы доклада на Научно-практической конференции «Мультидисциплинарный взгляд на метаболический синдром», Санкт-Петербург, 27-28 сентября 2012*

Среди причин избыточного веса при метаболическом синдроме следует учитывать факторы, не зависящие от образа жизни и питания. Недостаточно информации о роли исходной организации митохондриального метаболизма в формировании избыточного веса, развития артериальной гипертензии. Наличие дефектов путей пополнения интермедиатов цикла Кребса может вносить вклад в нарушение окисления жирных кислот, в том числе уксусной кислоты.

**Цель** исследования заключалась в изучении параметров митохондриальной дисфункции у лиц с сердечно-сосудистыми заболеваниями с повышенным артериальным давлением в старшей возрастной группе.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на базе клиник СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. В 187 образцах плазмы крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями старше 55 лет с уровнем систолического/диастолического артериального давления  $139 \pm 2,0 / 89 \pm 2,9$  мм рт. ст. были определены биохимические параметры характеризующие митохондриальную и эндотелиальную дисфункции. ВЭЖХ-анализом исследовали уровни сукцината и метилмалоновой кислоты; спектр аминокислот анаплеротических источников сукцината; общего гомоцистеина (oГци). Уровни глюкозы, лактата и пирувата – спектрофотометрическим методом. Уровни Д-димера, витаминов **B12** и фолиевой кислоты определяли методом ИФА – анализа. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием лицензионной

программы SPSS15 критериями знаковых рангов Вилкоксона и корреляционным анализом по Спирмену.

**Результаты.** Показано, что митохондриальная дисфункция у лиц старше 55 лет с гипергомоцистеинемией и метилмалоновой ацидезией сопровождается пониженным уровнем метаболитов ее предшественников, таких как валин, лейцин и накоплением метилмалоновой кислоты. Одним из участков метаболического пути поставки интермедиатов цикла Кребса является путь образования сукцината через метилмалоновую кислоту. Этот путь позволяет пополнять интермедиаты цикла Кребса из неуглеводных источников. Существенное повышение уровней лактата, пирувата и метилмалоновой кислоты сочетающееся со снижением уровней «разветвленных» аминокислот при отсутствии В12 дефицита в крови, свидетельствует о развитии вторичной митохондриальной дисфункции на фоне дефицита в плазме крови пациентов старшей возрастной группы аминокислот анаплеротических источников сукцината. Это свидетельствует о нарушении пополнения интермедиатов цикла Кребса через метилмалонат. Накопление этой кислоты сопровождается повышением уровня пропионил-СоА, являющегося ингибитором пируватдегидрогеназного комплекса. Это объясняет обнаруживаемую в изученной группе пациентов лактоацидемию.

**Вывод.** Системные проявления митохондриальной дисфункции у лиц старшей возрастной группы отличаются от известных проявлений для группы взрослых, тем, что характеризуются понижением уровня разветвленных аминокислот.

Т.Ф. Субботина<sup>1,2</sup>, В.В. Дорофейков<sup>2</sup>  
**ФИБРИНООБРАЗОВАНИЕ И ФИБРИНОЛИЗ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ  
СИНДРОМЕ**

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

2 Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова

*Тезисы доклада на Научно-практической конференции «Мультидисциплинарный взгляд на метаболический синдром», Санкт-Петербург, 27-28 сентября 2012*

Метаболический синдром (МС) характеризуется гиперкоагуляцией и гипофибринолизом, в генез которых бесспорный, но не единственный вклад вносят повышенные концентрации фибриногена и ингибитора активатора плазминогена. Однако значение измененного белково-липидного состава крови, который может оказывать существенное влияние на свойства фибринового сгустка и модулировать процесс гемостаза, недостаточно изучено.

**Цель.** Изучить особенности нарушений заключительных этапов свертывания крови и фибринолиза у пациентов с МС в зависимости от биохимических показателей крови.

**Материалы и методы исследования.** Исследованы образцы бедной тромбоцитами цитратной плазмы 80 пациентов с МС (34 женщины и 46 мужчин, средний возраст 51 год) и 31 здорового донора (23 женщины и 8 мужчин, средний возраст 49 лет). Оценку свертывания крови на этапе тромбин-индуцированного фибринообразования и фибринолиза, активированного стрептокиназой, проводили турбидиметрическим методом. Концентрацию фибриногена оценивали методом Клаусса. Биохимические тесты включали концентрацию глюкозы, показатели липидного обмена (общий холестерин (ХС), триглицериды (ТГ), ХС ЛНП, ХС ЛВП), которые определяли в сыворотке крови энзиматическими колориметрическими методами, и уровень С-реактивного белка (СРБ), который определяли высокочувствительным иммунотурбидиметрическим методом. Статистический анализ проводили с использованием общепринятых методов параметрической и непараметрической

статистики. Проверку на нормальность распределения показателей проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка.

**Результаты.** По данным турбидиметрического анализа, у 81% пациентов с МС выявлена гиперкоагуляция на этапе фибринообразования, в то время как ингибирование фибринолиза отмечено лишь у 14%. Максимальная оптическая плотность фибринового сгустка была достоверно выше, чем у здоровых лиц. Степень гиперкоагуляции не коррелировала с концентрацией фибриногена, уровень которого ( $2,94 \pm 0,092$  г/л) хотя и был достоверно выше, чем у здоровых лиц ( $2,54 \pm 0,126$  г/л), однако не превышал границы референтного интервала. В комплексе биохимических показателей у пациентов с МС выявлены достоверные изменения, характерные для данной патологии: умеренная гипергликемия (80% пациентов), повышенный уровень СРБ (67% пациентов) и дислипидемия (60% пациентов). Особенно существенно была понижена концентрация ХС ЛВП ( $1,15 \pm 0,103$  мМ у пациентов с МС и  $1,86 \pm 0,072$  мМ в группе здоровых лиц). Длительность фибринолиза положительно коррелировала с уровнем СРБ ( $r_s=0,36$ ,  $p<0,005$ ), тогда как корреляции с ХС ЛВП были отрицательными ( $r_s = -0,27$ ,  $p<0,01$  у пациентов и  $r_s = -0,37$ ,  $p<0,001$  у здоровых лиц).

**Вывод.** Одной из причин гиперкоагуляции и гипофибринолиза при МС является измененный белково-липидный состав плазмы крови, в частности, повышенная концентрация СРБ и дефицит ХС ЛВП.

Е.С. Алексеевская  
**ВЛИЯНИЕ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА АНАЛИЗА НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
КОНЦЕНТРАЦИИ ЛАКТАТА В КРОВИ**

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

*Тезисы доклада на Научно-практической конференции «Мультидисциплинарный взгляд на  
метаболический синдром», Санкт-Петербург, 27-28 сентября 2012*

Метаболический синдром – это комплекс метаболических, гормональных и клинических нарушений, являющихся факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Патология энергообмена, а именно нарушение клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования является основным патогенетическим механизмом развития сердечной патологии. Ранняя диагностика нарушений процессов клеточной энергетики возможна на основании определения уровня молочной и пировиноградной кислот на фоне стандартного глюкозотолерантного теста.

Цель – оценить влияние преаналитического этапа анализа на определение концентрации лактата в крови.

Материалы и методы. В работе приняли участие 80 здоровых доноров (33 мужчины и 47 женщин) в возрасте от 30 лет до 61 года (средний возраст в группе составил  $41,3 \pm 1,2$ ). Также были обследованы 73 пациента (34 мужчины и 39 женщин) с активацией внутрисосудистого свертывания и фибринолиза (уровень D-димера  $> 500$  нг/мл) в возрасте от 21 года до 75 лет (средний возраст  $61,5 \pm 1,0$ ). Кровь доноров центрифугировали для получения плазмы в течение от 1,5 до 3 часов от момента ее забора, а пациентов в течение 30 минут. Фильтрат плазмы получали центрифугированием при 2000 g в течение 1 часа с использованием центробежных концентраторов Vivaspin 2 с мембраной 3,000 MWCO PES (Sartorius Stedim Biotech, Германия). Концентрацию лактата в плазме и фильтрате плазмы крови определяли колориметрически с помощью лактатоксидазного теста (Olvex Diagnosticum, Россия).

Результаты. В группе здоровых лиц среднее значение концентрации лактата в плазме крови составило  $3,45 \pm 0,13$  ммоль/л. Таким образом, у 69 доноров (86%) концентрация лактата в плазме крови превысила верхнюю границу референтного интервала равную 2,44 ммоль/л. В фильтрате плазмы здоровых лиц концентрация лактата составила  $4,23 \pm 0,15$  ммоль/л. У 57 доноров концентрация лактата в фильтрате плазмы крови была выше, чем в плазме в среднем на  $39,0 \pm 3,7\%$ , а у отдельных лиц была повышена более чем в 2 раза. В группе лиц с повышенным уровнем D-димера среднее значение концентрации лактата в фильтрате плазмы крови составило  $3,47 \pm 0,17$  ммоль/л. Концентрация лактата была выше 2,44 ммоль/л у 55 пациентов (75%), но достоверно ниже значений лактата в фильтратах плазмы здоровых лиц (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,01$ ).

Выводы. Длительное процессирование крови приводит к повышению уровня лактата за счет активного гликолиза в эритроцитах. Это объясняет высокую, на уровне лактоацидемии, концентрацию молочной кислоты у здоровых лиц, превышающую значения даже у лиц с патологическим процессом. Определять концентрацию лактата с использованием подобных ферментативных тестов целесообразнее не в плазме, а в фильтратах плазмы крови. По-видимому, ферменты плазмы, а именно каталаза, влияют на развитие цветной реакции связанной с образованием пероксида водорода и приводят к искажению результатов анализа. Данные факторы необходимо учитывать при диагностике метаболического синдрома и оценке его тяжести.



A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, D.S. Lupan, V.A. Bogova, and O.A. Kusheleva  
**ARGININE AND LYSINE AS PRODUCTS OF BASIC CARBOXYPEPTIDASE  
ACTIVITY ASSOCIATED WITH FIBRINOLYSIS**

St.-Petersburg State I.P. Pavlov Medical University, ul. L. Tolstogo 6/8, Saint-Petersburg, 197022 Russia;  
e-mail: subbotina2002@mail.ru

*Тезисы статьи, опубликованной в журнале «Biochemistry» (Moscow), Supplement Series B «Biomedical Chemistry» в 2012 году:*

*Zhloba A.A., Subbotina T.F., Lupan D.S., Bogova V.A., and Kusheleva O.A. Arginine and Lysine as Products of Basic Carboxypeptidase Activity Associated with Fibrinolysis // Biochemistry, Springer. – Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 2012, Vol. 6, No. 3, pp. 261–265.*

**Abstract**—Blood carboxypeptidases play an important role in the regulation of fibrinolysis. We have proposed here the method for the assay of blood carboxypeptidase activity associated with coagulation/fibrinolysis using the natural substrate fibrin and the detection of basic amino acids arginine and lysine as products under conditions closely resembling those in vivo. Plasma samples from 15 patients with arterial hypertension have been investigated. Coagulation and subsequent fibrinolysis were initiated by addition of standard doses of thrombin and tissue plasminogen activator, respectively. Arginine and lysine concentrations before, during, and after completion of fibrinolysis were determined using HPLC. The parameters of fibrinolysis were evaluated by the clot turbidity assay. The coagulation/fibrinolysis cycle was accompanied by a significant increase in concentrations of arginine and lysine in the incubation mixture by 101 and 81%, respectively. The duration of fibrinolysis initiation significantly correlated with the degree of increase of these amino acids:  $r_S = -0.733$  and  $-0.761$  for arginine and lysine, respectively ( $p < 0.05$ ). Arginine generation had two maximums: one in the beginning of clot lysis and another one at the end of the lysis, whereas the lysine release occurred mainly in the middle of fibrinolysis. Thus, the carboxypeptidase activity associated with fibrinolysis can be considered as a local source of the essential amino acids originated from fibrin clot degradation products.

*Keywords:* fibrinolysis, basic carboxypeptidases, arginine, lysine

**DOI:** 10.1134/S1990750812030158

L.A. Alexandrova<sup>1,2</sup>, A.A. Zhloba<sup>1,2</sup>, E.S. Alexeevskaya<sup>1,2</sup>

## OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH INTRAVASCULAR COAGULATION DISTURBANCE

<sup>1</sup> The Saint-Petersburg State Pavlov Medical University, SC Department of Biochemistry, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> V. A. Almasov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center, Saint Petersburg, Russia

*Тезисы статьи, направленной в редакцию журнала "Biochemia medica" (Хорватия) в 2013 году*

### Abstract

**Introduction.** Vascular pathology closely associated with aging, oxidative stress, endothelial and mitochondrial dysfunctions. The aim of the study was to assess whether the oxidant/antioxidant status of blood plasma changes in patients with activation of intravascular coagulation and fibrinolysis (AIVCF) in aspects of aging.

**Materials and methods.** We studied the specimens of blood plasma of 109 patients (76 male and 33 female; median age 52(QIR 37-67) with AIVCF and d-dimer level >500 µg/L and 30 healthy controls.

**Results.** There were the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was higher in patients (8.5 (QIR 6.5-10.6) µmol/L vs. 6.8 (QIR 5.8-7.4) µmol/L; respectively (P=0.001), SH-groups level was lower (106.4 (84.8-140.8)) µmol/L vs. 168.2 (QIR 140.2-214.3) µmol/L, and superoxide dismutase (SOD) activity was lower (7.6 (QIR 5.8-12.4) U/ml vs. 17.1 (QIR 13.9-19.6) U/ml; respectively; P=0.001) when we compared with the healthy controls. When all of the patients were divided into two age-related groups: group 1 (34(QIR 28–45) years) and group 2 (67(QIR 65–75) years) we estimated significance negative correlation ( $r = -0.528$ ,  $P = 0.01$ ) between TBARS and SOD in group 2. Plasma lactate level in elderly patients (group 2) did not differ from those in group 1, although was significantly higher in the both groups, when compared with the control.

**Conclusion:** AIVCF is accompanied by oxidative stress and lactacidemia independently of age. Appearance markers of oxidative stress (TBARP and

SOD activity in plasma) and lactacidemia may be used for case study development and new therapeutic team approach to the AIVCF.

**Key words:** superoxide dismutase, thiobarbituric acid reactive substances, activation of intravascular coagulation and fibrinolysis, lactacidemia

A.A. Zhloba

**S-HOMOCYSTEINYLACTION OF THE MACROMOLECULAR PLASMA  
PROTEINS INCLUDING ALPHA-2-MACROGLOBULIN**

Pavlov State Medical University, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg,  
Russia

*Тезисы доклада на Международной конференции “Chemistry for health”, Афины, 9-14 сентября 2012*

The mechanisms of homocysteine (Hcy) participation in atherogenesis and progression of atherothrombotic diseases are unclear, but results from D. Jacobsen's and our laboratory have shown that Hcy can target plasma alpha-2-macroglobulin (**a2M**) [1]. According to our joint study this macromolecular protein (Mr=720 kDa) can be considered as a probable transporter of Hcy in appropriate pathologic conditions. Elevated levels of total homocysteine (tHcy) in many cases are not a predictor closely related with unfavorable outcomes of atherothrombotic diseases. Our proposal consisted in additional diagnostic capacity of the macromolecular plasma protein bound fraction of Hcy, which can be tested by the same analytic procedure as tHcy which applied to ultrafiltrate fraction of plasmas species.

Evaluation of the tHcy concentration in fractions of plasma was the aim of the present study. Results of tHcy measurement were represented in rates of plasma tHcy, its concentration in ultrafiltrate across the membrane, as fHcy. Filtration procedure was performed with Vivaspin 100 MVCO PES and 300 MVCO PE Sartorius. 500  $\mu$ l of the 5 fold diluted samples of plasmas with and without activation procedure of A2M by trypsin were applied to ultrafiltration system. All statistical calculations were performed using non parametric tests with SPSS software. Blood plasma of patients with cardiovascular diseases with hyperhomocysteinemia (HHcy) from 15 to 20  $\mu$ mol/l, (n=7) and with HHcy from 20 to 70  $\mu$ mol/l, (n=7). Plasma tHcy and fHcy levels were determined by using HPLC system Agilent 1100 after derivatization with Ellman's reagent [2]. Filtration of the proteins bound Hcy across the 100 MVCO PES membranes was very low with a mean rate of 15% of tHcy quantity. 300 MVCO PES filters had 37% Hcy filtration capacity for species with tHcy from 15 to 70  $\mu$ mol/l. In both

HHcy groups correlations between tHcy and fHcy rates were insignificant for HHcy from 15 to 20  $\mu\text{mol/l}$  ( $R=-0.70$ ,  $p>0.05$ ), and for 20 to 70  $\mu\text{mol/l}$  ( $R=-0.55$ ,  $p>0.05$ ). Retention of Hcy with macromolecular material of plasma estimated by the ultrafiltration technique was significantly higher after of a2M activation by trypsin. This data provide evidence of Hcy elevation in macromolecular fraction of plasmas after activation of a2M.

[1] Catanescu C. O.; Willard B. B.; Kinter M. T.; Zhloba A. A. and Jacobsen D. W., *The FASEB Journal*. **2008**,22,1057.3.

[2] Zhloba A. A.; Blashko E. L. *Journal of Chromatography B*. **2004**, 800, 275.

***This work was supported by Pavlov State Medical University and Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre.***

T.F. Subbotina<sup>a,b</sup>, A.A. Zhloba<sup>a,b</sup>, E.S. Alekseevskaya<sup>a</sup>  
**FIBRINOLYSIS AS A PROCESS OF MODIFYING THE ON-SITE  
CONCENTRATIONS OF BASIC AMINO ACIDS**

a SC Department of Biochemistry of St. Petersburg I. P. Pavlov State Medical University  
b FSI Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre

*Тезисы доклада на Международной конференции “Chemistry for health”, Афины, 9-14 сентября 2012*

Plasmin, the principal enzyme of the fibrinolytic system, is a serine endoproteinase of broad substrate specificity. But some exopeptidase activity also may appear during coagulation and subsequent fibrinolysis [1] including thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, or carboxypeptidase U, EC 3.4.17.20), carboxypeptidase N (EC 3.4.17.3), and small but detectable amounts of tissue carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2). All these enzymes are basic carboxypeptidases which can cleave the C-terminal lysine and arginine residues from fibrin.

The aim of the investigation was the elaboration of the method for detection of blood carboxypeptidase activity associated with coagulation/fibrinolysis using the natural substrate fibrin by means of detection of reaction products, basic amino acid lysine and arginine and to estimate the significance of amino acid profile modification.

Plasma samples from 15 patients with arterial hypertension have been investigated. Coagulation and subsequent fibrinolysis were initiated by addition of standard doses of thrombin and tissue plasminogen activator, respectively. Arginine and lysine concentrations before, during, and after completion of fibrinolysis were determined by RP-HPLC using Agilent 1100 chromatograph and Zorbax C18 column after derivatization with ortho-phthaldialdehyde [2]. Control samples were incubated in the same conditions without clot formation. The parameters of fibrinolysis were evaluated by the clot turbidity assay.

The coagulation/fibrinolysis cycle was accompanied by a significant increase in concentrations of arginine and lysine in the incubation mixture by 101 and 81%, respectively. The duration of fibrinolysis initiation significantly

correlated with the degree of increase of these amino acids:  $r_s = -0.733$  and  $-0.761$  for arginine and lysine, respectively ( $p < 0.05$ ). Thereby fibrinolysis can be considered as a local source of the essential amino acids originated from fibrin clot degradation products. This on-site increase in arginine concentration during fibrinolysis can be important for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity. Activation of eNOS leads to increase NO production and vasodilatation. Thus, it appears that active fibrinolysis provides not only clot lysis but also vasodilatation and restoration of blood circulation.

#### References

- [1] Redlitz, A.; Tan, A. K.; Eaton D. L. et al. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 2534.
- [2] Mengerink, Y.; Kutlán, D.; Tóth, F. et al. *J. Chromatogr. A* **2002**, *949*, 99.

E.S. Alexeevskaya<sup>a</sup>, A.A. Zhloba<sup>a,b</sup>, T.F. Subbotina<sup>a,b</sup>

**THE INFLUENCE OF PREANALYTICAL PHASE ANALYSIS TO DETERMINE  
THE CONCENTRATION OF LACTATE IN THE BLOOD**

a SC Department of Biochemistry of St.-Petersburg State I. P. Pavlov Medical University

b FSI Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre

*Тезисы доклада на Международной конференции “Chemistry for health”, Афины, 9-14 сентября 2012*

The concentration of lactate in the blood is one of the most extended marker of mitochondrial dysfunction [1].

We examined 80 healthy volunteers (33 males and 47 females) aged from 30 to 61 years (mean age group was  $41.3 \pm 1.2$ ). Also 73 patients (34 men and 39 women) with the activation of intravascular coagulation and fibrinolysis (D-dimer level  $> 500$  ng/ml) were examined in age from 21 to 75 years (mean age  $61.5 \pm 1.0$ ). The donor's blood was centrifuged to obtain plasma within 1.5 to 3 hours from the time of blood collecting, and patients within 30 minutes. The filtrate of plasma was obtained by centrifugation at 2000 g for 1 hour using ultrafiltration spin columns Vivaspin 2 with 3,000 MWCO PES membrane (Sartorius Stedim Biotech, Germany). The concentration of lactate in plasma and plasma's filtrate was determined by enzymatic photolorimetric test using the lactate oxidase (Olvex Diagnosticum, Russia).

In the group of healthy subjects the mean concentration of lactate in plasma was  $3.45 \pm 0.13$  mmol/l. Thus, in 69 donors (86%), lactate concentration in plasma exceeded the upper limit of the reference interval equal to 2.44 mmol/l [2]. The lactate concentration in plasma's filtrates of healthy individuals was  $4.23 \pm 0.15$  mmol/l. In 57 donors, lactate concentration in the filtrate of plasma was higher than in plasma by an average of  $39.0 \pm 3.7$  %, while some individuals demonstrated more than 2-fold increase.

In the group with elevated D-dimer mean lactate concentration in the filtrate of plasma was  $3.47 \pm 0.17$  mmol/l and was significantly lower values of lactate in the filtrates of plasma of healthy individuals (Mann-Whitney test,



p<0.01). Lactate concentration was above upper limit of the reference interval in 55 patients (75%).

Thus, these results demonstrate the importance of the preanalytical phase especially for determination of lactate in the blood. The prolongation of blood processing leads to increased levels of lactate owing to active glycolysis in red blood cells. This explains the overestimation of lactic acid levels in healthy subjects, even exceeding the patients' values. Another conclusion is the need to analyze lactate using enzymatic tests in filtrates of plasma but not in plasma. Apparently, plasma enzymes, namely catalase, influence the development of color reaction associated with the formation of hydrogen peroxide and distort test results.

#### References

- [1] Haas, R. H.; Parikh, S.; Falk, M. J. et al. *Int. J. Molecular Genetics and Metabolism*. **2008**, *10*, 1016.
- [2] Lentner, C. *Int. J. Medical Education Division*. **1981**, *1*, 165.

A.A. Zhloba<sup>1,2</sup>; T.F. Subbotina<sup>1,2</sup>; E.S. Alexeevskaya<sup>1,2</sup>; I.A. Rodin<sup>3</sup>; A.N. Stavriani<sup>3</sup>; O.A. Shpigun<sup>3</sup>

**SAMPLE PREPARATION WITH AMINOTHIOL DERIVATIZATION FOR METABOLIC CHARACTERIZATION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION**

<sup>1</sup> Biochemical Department of Scientific Centre, Pavlov State Medical University of St.Petersburg, Russia. <sup>2</sup> Proteomics Group, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St.-Petersburg, Russia. <sup>3</sup> Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Russia.

*Тезисы доклада на 1st International Symposium on Profiling, который состоится в Costa da Caparica (Portugal) 2-4 сентября 2013*

**Abstract**

High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method has proven to be a useful method in clinical screening. Plasma metabolic markers (free carnitine, 17 amino acids and 7 low molecular mass organic acids) associated with mitochondrial and endothelial dysfunction were recently investigated by our group [1]. Metabolic markers of endothelial dysfunction should be evaluated with quantitative determination of aminothiols [2]. The evaluation of aminothiols in plasma has been reported in many valuable and interesting works [3,4]. Disulfide-exchange and oxidative reactions take place in plasma samples, causing a protein-bound homocysteine formation. It was shown that aminothiols, especially homocysteine were lost after proteins sedimentation. In this study, a HPLC-MS/MS assay of metabolic markers of endothelial dysfunction, was developed. The HPLC part of the analytical apparatus combined a binary pump, an autosampler (injection volume - 20  $\mu$ l) and a column oven. Chromatographic separation occurred on a Synergi Polar RP-C18 column, 2.0 mm  $\times$  250 mm, 4  $\mu$ m (Phenomenex, USA) at a flow rate of 0.5 ml\*min<sup>-1</sup>. The column was eluted with 20 mM ammonium acetate in water (A) and acetonitrile (B) in isocratic mode with the ratio: 95:5 (A:B). Mass spectrometric detection was done with an Applied Biosystems/Sciex Q-Trap 3200 (Darmstadt, Germany) triple quadrupole instrument in sensitive MRM mode, equipped with ElectroSpray Ionization (ESI) interface which was operated in positive and negative ion modes, separately. Data handling and

quantification were done with AppliedBiosystems/MDS Analyst 1.5 software. Random human plasma specimens were used for above mentioned markers assay. Recovery, precision and linearity were determined using acetonitrile standard solutions of carnitine, amino acids and low molecular mass organic acids and three aminothiols at various concentrations. Experiments with 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), (DTNB) derivatization technique of aminothiols were done as previously described [5]. Each aminothiol in plasma is the sum of species including mixed disulfides with cysteine residues of plasma proteins. To accomplish these goals, we had to modify the assay to be able to measure total aminothiols in human plasma or serum, besides other targeted metabolites. Total plasma aminothiol rates were revealed after reduction step with dithiothreitol or dimercaptpropansulfonate. Plasma samples were further processed after deproteinization. Conclusion: The experimental results suggest that proposed procedure of sample preparation have practical application in clinical characterization of endothelial dysfunction. Quantitative profiling of metabolites related to endothelial dysfunction should be realized by quantification of amino acids, carnitine, low molecular mass organic acids and aminothiols with total homocysteine.

#### References

1. Stavrianiidi A., Braun A., Ananieva I., Rodin I., Shpigun O., Zhloba A. LC-MS/MS method for simultaneous determination of anaplerotic dysfunction, methylmalonic acidemia and endothelial dysfunction metabolic markers in human plasma. 8th ANNUAL LC/MS/MS WORKSHOP ON ENVIRONMENTAL APPLICATIONS AND FOOD SAFETY. 2-4 July 2012; Barcelona, Spain.
2. Ueland, P.M., Midttun, O., Windelberg, A., Svardal, A., Skålevik, R., Hustad, S. Quantitative profiling of folate and one-carbon metabolism in large-scale epidemiological studies by mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007;45(12):1737–1745.
3. Jacobsen D.W. Total Plasma Homocysteine: The Mediator/Marker Controversy Continues. *Clin Chem* 2009; 55(9):1742-1743.
4. Ueland P.M. Citation classic: importance of chemical reduction in plasma and serum homocysteine analysis. *Clin Chem* 2008;54: 1085-1086.
5. Zhloba A., Blashko, E. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection. *Journal of Chromatography B.* 2004; 800: 275-80.

I. Rodin<sup>1</sup>; O. Shpigun<sup>1</sup>; A. Braun<sup>1</sup>; A. Stavriani<sup>1</sup>; A. Zhloba<sup>2</sup>  
**LC-MS/MS METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF  
ANAPLEROTIC DYSFUNCTION, METHYLMALONIC ACIDEMIA AND  
ENDOTHELIAL DYSFUNCTION METABOLIC MARKERS IN HUMAN PLASMA**

<sup>1</sup>Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>St Petersburg State I.P. Pavlov Medical University, St Petersburg, Russian Federation

*Тезисы доклада на 8th ANNUAL LC/MS/MS WORKSHOP ON ENVIRONMENTAL APPLICATIONS  
AND FOOD SAFETY, 2-4 July 2012, Barcelona, Spain*

### **Abstract**

High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method has proven to be a useful method in clinical screening, able to detect errors of fatty acid oxidation, amino acid, organic acid and carnitine metabolism. Furthermore, this method is becoming increasingly applied in selective screening and in prenatal and postmortal diagnostics of metabolic disorders, where blood plasma is commonly used as specimen of interest. Anaplerotic dysfunction, methylmalonic acidemia and endothelial dysfunction should be considered as a possible factor of initiation and progression of arterial hypertension and other cardiovascular diseases. Metabolic markers of these dysfunctions should be determined in its earliest stage to prevent the initiation of cardiovascular diseases. We therefore developed and validated a fast method of simultaneous amino acids, organic acids and carnitine profiling in blood plasma by HPLC-MS/MS (previously these metabolic markers were determined separately with the help of different sample preparation procedures and methods). Random human plasma specimens were used for investigation of the analytical imprecision of the method. Recovery, precision and linearity were determined using acetonitrile standard solutions of free carnitine, 17 amino acids and 7 low molecular mass organic acids at various concentrations. The mean coefficients of variation of within-run and run-to-run analysis of these analytes were found between 5% and 10% and demonstrated that the method fulfils the analytical requirements within the relevant ranges of concentration. In conclusion, the method is ideally suited for high-throughput analysis of large

numbers of samples in clinical studies and metabolomics research and the number of substances under investigation can be increased in future.

## **Раздел II**

### **Конкурсные научные работы молодых ученых и студентов**

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

Д.С. Алексеева  
**УРОВЕНЬ ТРИМЕТИЛЛИЗИНА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА КАРНИТИНА У  
ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА**

*(научные руководители – д.м.н., проф. А.А. Жлоба, д.м.н. О.М. Моисеева)*  
Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова,  
Отдел биохимии НИЦ

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова

**Введение.** Известно, что у пациентов с нарушением липидного метаболизма оправданной во многих случаях является активизация транспорта жирных кислот и повышение уровня эндогенного карнитина. На практике не учитывается состояние образования собственного эндогенного карнитина, которое лимитировано наличием предшественника – триметиллизина (ТМЛ), образующегося в результате эндогенного протеолиза белков.

**Цель** настоящей работы заключалась в изучении возможности использования катионнообменных картриджей для экстракции основных аминокислот из плазмы крови, в т.ч. ТМЛ и асимметричного диметиларгинина (АДМА), а также оценить характер изменений ТМЛ у пациентов с атеросклерозом аорты *с проведенной коррекцией нарушений липидного обмена.*

**Материалы и методы.** Методом ВЭЖХ анализа определяли аминокислоты, а также минорные основные аминокислоты, включая ТМЛ, АДМА и их предшественники – аргинин и лизин. Данные по содержанию холестерина и его фракции, С-реактивного белка были получены из истории болезни Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А.Алмазова. В качестве материала было использовано 20 образцов плазмы крови пациентов с нарушениями липидного обмена. Биохимические показатели изучали, забирая плазму крови пациентов в возрасте: медиана 62 года, 25-75 квартили, 58-64 года; из них 16 мужчин, 4 женщины. Статистический анализ проводили методами непараметрической статистики с определением межгрупповых различий методом Вилкоксона и корреляционных взаимосвязей методом Спирмена.

Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05. Статистическую обработку материала выполняли с использованием программы SPSS 16.

**Результаты.** В результате проведенного исследования на модельных растворах основных аминокислот, а также АДМА и ТМЛ было показано, что для их совместной экстракции можно использовать слабокатионообменные картриджи твердофазной экстракции Oasis Strata X-CW фирмы Phenomenex США. После экстракции ВЭЖХ-анализ проводили с ортофталатными производными указанных веществ, проводя градиентную элюцию на колонке Phenomenex Luna C18 (2) 4,6x250мм, 5  $\mu$ М.

Содержание ОХ, (хЛПНП), СРБ, ТМЛ, АДМА, лизин, общий гомоцистеин (оГци) варьировало (медиана, 25-75 перцентили): 5,2 (4,2 – 5,5) мМ; 3,0 (2,4 – 3,8) мМ; 1,3 (0,72 – 4,7) мг/л; 8,2 (4,4 – 28,8) мкМ; 0,65 (0,2 – 2,0) мкМ; 63,7 (33,8 – 128,4) мкМ, 9,1 (7,1-10,7) мкМ, соответственно. ОХ пациентов соответствовал пределам референтного интервала (2,33 – 4,92 мМ для мужчин) и (2,59 – 6,09 мМ для женщин) старшей возрастной группы (ТИЦ, 1986), хЛПНП у них был менее 3,3 мМ/л. СРБ также находился в пределах референтного интервала для возрастной группы 50-64 года, (Herbert В., 2001). оГци был повышен по сравнению с оГци группы сравнения – 6,1 (5,3-7,1) мкМ.

Содержание С-реактивного белка обнаруживало положительную корреляцию с уровнем ТМЛ ( $p=0,08$ ;  $R=0,4$ ), что, возможно, связано с усилением обмена веществ и высвобождением большего количества ТМЛ в результате активизации эндогенного протеолиза. В то же время АДМА не обнаруживал связи ни с хЛПНП, ни с СРБ, ни с самим ТМЛ ( $p=0,13$ ; 0,1 и 0,4;  $R=1,0$ ; 0,7 и 0,9, соответственно). Это было связано с тем, что для исследования были использованы образцы пациентов с атеросклерозом аорты после терапии без выраженного отклонения показателей липидного



обмена и уровнем оГци 9,1 (7,1-10,7) мкМ, приближающимся к референтной границе умеренной гипергомоцистеинемии. Обнаружено, что с увеличением концентрации хЛПНП наблюдается тенденция к снижению концентрации ТМЛ ( $p=0,07$ ;  $R=-0,41$ ). По-видимому, не смотря на умеренное повышение показателей липидного обмена и оГци, в изученной группе пациентов сохраняется торможение синтеза важного метаболита-ТМЛ, который является участником митохондриальной стадии метаболического пути биосинтеза карнитина.

**Выводы.** Разработанную методику можно рекомендовать для оценки уровня триметиллизина в качестве важнейшего метаболита, лимитирующего образование эндогенного карнитина.

Е.С. Алексеевская  
**МЕТАБОЛОМНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ  
ДИСФУНКЦИИ**

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

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

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова

[alizlex@mail.ru](mailto:alizlex@mail.ru)

**Введение.** Оценка метаболома является наиболее объективной и информативной характеристикой фенотипа.

**Цель.** Оценка системных метаболических сдвигов при установленной митохондриальной дисфункции (МД).

**Материалы и методы.** Исследованы образцы плазмы крови пациентов ( $n=34$ , от 50 до 83 лет) с уровнем *D*-димера выше 500 нг/мл и доноров ( $n=20$ , от 55 до 61 года). Наличие МД верифицировали по уровню лактата (*LA*)  $\geq 2,2$  ммоль/л. Определяли также цитохром *C* (*CytC*), общий гомоцистеин (*tHcy*) и спектр аминокислот (*AA*).

**Результаты.** Уровень *tHcy* у пациентов был достоверно выше, чем у доноров – 11(8-12) мкмоль/л. Значения медиан концентраций *Ala*, *Ile* и *Leu* в группе пациентов превышали 75 перцентиль соответствующих референтных интервалов. Положительная связь между концентрацией *CytC* и уровнями *Ile* и *Gly* в группе пациентов ( $r=0,41$  и  $r=0,42$  соответственно;  $p<0,05$ ) подтверждала наличие МД, выявленной по уровню *LA*. Факторный анализ выделил четыре группы показателей (*Ft*). К *Ft4* относились *tHcy*, *CytC*, *Gly*, *Ile* и (-)*Ser*.

**Выводы.** Таким образом, МД в группе пациентов сопровождалась сдвигами метаболитов, в частности *AA*, катаболизм которых в наибольшей степени связан с реакциями цикла Кребса и митохондриального декарбоксилирования. Исследование позволило выявить кооперативные сдвиги, являющиеся фенотипической метаболомной характеристикой состояния МД. Диагностический подход оценки небольших сдвигов метаболома перспективен при внедрении современных аналитических методов в клиническую биохимию.

Ю.А. Асташова, Е.В. Шилина, О.В. Пищиков  
**СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ПРОТЕОМИКИ ПРИ ИШЕМИИ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ**

*(научные руководители – к.м.н. Н.А. Малиновская, асп. Ю.К. Комлева)*

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

Кафедра биологической химии с курсом медицинской,

кафедра фармацевтической и токсикологической химии

НИИ молекулярной медицины и патобиохимии

[Yulka\\_grusha@mail.ru](mailto:Yulka_grusha@mail.ru)

Актуальность нейродегенеративных заболеваний и ишемии головного в современном мире объясняется следующими факторами: частотой развития в пожилом возрасте, снижением качества жизни пациентов, инвалидизацией и даже смертью у многих пациентов (частота встречаемости 5-20% у лиц старше 60 лет, а летальность при ишемии головного мозга 56,1% от числа умерших, при нейродегенерации – 66,7% заболевших). Использование современных методов исследования, таких, как протеомный анализ, является точным методом поиска потенциальных молекул-маркеров и молекул-мишеней, а также изучения механизмов патогенеза этих патологий, что немало важно при разработке лечения, в том числе и персонализированного. Цель работы - обзор литературы о применении метода протеомного анализа при ишемии головного мозга и нейродегенерации (болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона).

Наука протеомика, основным предметом изучения которой являются белки и их взаимодействия в живых организмах, в современном мире занимает значимое положение. Прогнозы ВОЗ сообщают о неуклонном росте больных нейродегенеративными заболеваниями в ближайшем будущем. Установление молекулярных механизмов, патохимических структур центральной и периферической нервной системы и разработка путей управления этими процессами позволяет контролировать исход нейродегенеративных заболеваний, своевременную диагностику и улучшение качества жизни пациентов с подобными недугами[1].

Протеомный анализ может осуществляться с помощью различных методов (иммуноблоттинг, белковые биочипы, 2D и 3D гель-электрофорез-

масс-спектрометрия, жидкая хроматография-масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез-масс-спектрометрия, SELDI-TOF-масс-спектрометрия, MALDI-TOF-масс-спектрометрия, тандемная масс-спектрометрия и т.д.). В литературных источниках описываются эксперименты с использованием методов протеомного анализа. Они направлены на поиск потенциальных маркеров неврологических заболеваний, выяснение роли белков в их патогенезе. Также протеомный анализ может использоваться для количественного определения ранее известных и неизвестных маркерных белков, функциональной характеристики компонентов путей сигнальной трансдукции, изучения белок-белковых взаимодействий в норме и при патологиях нервной системы, определения белковых модификаций и нарушений фолдинга белков. Описываются эксперименты, объектом исследования которых являются не только лабораторные животные, но и пациенты с определенными заболеваниями. В клинической лабораторной практике методы протеомного анализа могут использоваться для постановки диагноза, получения информации о прогнозе пациентов, для мониторинга процесса лечения и превентивной диагностики (выявление патологий нервной системы на доклинической стадии).

Материалом, пригодным для протеомного анализа у человека, являются спинномозговая жидкость, кровь, аутопсийный материал головного мозга, а в будущем, с использованием индуцированных плюрипотентных клеток возможно создание персонифицированных моделей неврологических патологий *in vitro*. Материалом для протеомного анализа в экспериментах на животных также могут являться кусочки мозга (слайс-культуры, гомогенаты или лизаты тканей), взятые от трупов животных или в процессе проведения операций, а также прижизненные перфузаты головного мозга, полученные с помощью микродиализной технологии. Протеомный анализ проводят в несколько этапов:

пробоподготовка выделенного материала (методы экстракции белков), выделение и сепарация целевых белков с использованием белковых чипов или гель-электрофореза, индикация (ионизация молекул и масс-спектрометрия) и идентификация белков (с помощью баз данных биоинформатики о структуре известных белков).

В одном из исследований определяли потенциальные маркеры для диагностики болезни Альцгеймера с помощью масс-спектрометрии и белковых чипов SAX2. Выявлены потенциальные биомаркеры – цистатин С,  $\beta$ -2-микроглобулин, VGF-пептид и неизвестный полипептид массой 7,69 кДа. Эти биомаркеры могут использоваться для диагностики болезни Альцгеймера и дифференциальной диагностики деменций, связанных или не связанных с ней, причем доказана высокая чувствительность и специфичность метода для данного применения, биомаркеры также могут использоваться для валидации этиологии болезни Альцгеймера, для тераностики – одновременного применения одного и того же маркера для терапии и диагностики болезни Альцгеймера [2].

Другим перспективным применением в неврологии является протеомный анализ при болезни Паркинсона. Диагностировать болезнь на ранних стадиях крайне проблематично, поэтому исследования с целью выявления маркеров заболевания очень ценны и информативны. В ходе исследования выявлены потенциальные маркеры болезни Паркинсона в аутопсийном материале среднего мозга людей – DJ-1 и UCH-L1, ферритин Н, глутатион-S-трансфераза [5]. Согласно другим авторам, в ликворе пациентов с болезнью Паркинсона были обнаружены 2 кандидатных белка, присутствующих у пациентов с паркинсонической деменцией в более значительном количестве, чем у контрольной группы [3]. Вышеуказанные маркеры могут быть использованы в неврологии для диагностики наследственных форм болезни Паркинсона и паркинсонической деменции.

Диагностика ишемии головного мозга в современной медицине еще развивается и широким шагом на этом пути может быть протеомный анализ. Выявление маркеров болезни на ранних стадиях – ключ к успешной терапии и сохранению качества жизни пациентов. Исследования, проводимые учеными, выявили потенциальные маркеры ишемии головного мозга: белок теплового шока 70-1 (Hsp70-1), 2-я изоформа дигидропиримидиназы (DRP2), глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP),  $\beta$ -актин. Они могут быть использованы в диагностике не только ишемии головного мозга, но и других патологий ЦНС [4].

Таким образом, протеомный анализ является одним из наиболее специфичных, чувствительных и крайне информативных методов. Перспективно его применение в неврологии для ранней диагностики ишемии головного мозга и нейродегенерации, их дифференциальной диагностике, особенно в трудных случаях. На основе литературного обзора экспериментальных достижений протеомики в области неврологии, мы планируем разработать дизайн собственного эксперимента в области протеомного анализа при экспериментальной ишемии головного мозга и нейродегенерации (ротеноновая модель болезни Паркинсона и амилоидная модель болезни Альцгеймера).

#### Список литературы

1. Сулина З.А., Иллариошкин С.Н., Пирадов М.А. Неврология и нейронауки – прогноз развития // Журнал Научного совета по неврологии РАМН и Минздравсоцразвития России. – 2007. – Т.1, №1. – С.5-9
2. Carrette O., Demalte I., Scherl A. A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease // Proteomics. – 2003. – Vol.3. – P.1486–1494.
3. Lehner tS. et al. iTRAQ and multiple reaction monitoring as proteomic tools for biomarker search in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease // Exp. Neurol. – 2012. – Vol.8(4). – P.180.
4. Oikawa S., Yamada T., Minohata T. et al. Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia–reperfusion // Free Radical Biology & Medicine. – 2009. – Vol.46. – P.1472–1477.
5. Werner C. J. R., Haussen H., Mall G., Wolf S. Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease // Proteome Science. – 2008. – Vol.6 (8). – P.1-14.

Д.Л. Беляев, М.Л. Куранова, Р.В. Романов  
**ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ  
ФУЛЛЕРЕНОВ НА КЛЕТКУ**

*(научные руководители – к.б.н., доц. И.М. Спивак, к.б.н., доц. В.Е. Стефанов)*

Институт цитологии РАН, лаборатория радиационной цитологии

[sderxc@gmail.com](mailto:sderxc@gmail.com)

**Введение.** Использование фуллеренов в фотодинамической терапии, имеет два основных препятствия: низкая растворимость в биологических жидкостях и неоднозначность в механизме действия в биологических системах.

**Цель.** Изучить влияние на рост и пролиферацию водорастворимых производных фуллеренов  $C_{60}$  и  $C_{70}$  на культуру фибробластов человека.

**Материалы и методы.** В работе использовались водорастворимые производные фуллеренов  $C_{60}$  и  $C_{70}$ . Для оценки воздействия на ДНК клеток было проведено иммуноцитохимическое выявление  $\gamma$ -H2AX и электрофорез отдельно взятых клеток.

**Результаты.** В результате комплексной статистической обработки данных выявлено развитие DDR-ответа, определяемого по появлению фосфорилированной формы гистона H2AX ( $\gamma$ -H2AX). Степень выраженности зависит от дозы использованного фуллерена. Показано, что действие производных фуллеренов  $C_{60}$  приводит к появлению двунитевых разрывов ДНК в несколько раз чаще, чем действие водорастворимых производных фуллеренов  $C_{70}$ .

**Выводы.** Полученные данные позволяют оценить действие водорастворимых производных фуллеренов  $C_{60}$  и  $C_{70}$  на фибробласты человека.

М.О. Новак, Ю.В. Картышкина  
**S-НИТРОЗОТИОЛЫ СЛЮНЫ КАК МАРКЕР ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ  
ДИСФУНКЦИИ**

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

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

[margarita-novak@yandex.ru](mailto:margarita-novak@yandex.ru)

**Введение.** Известно, что молекула оксида азота (II) (NO), будучи реакционно-способным соединением, оказывает прямое и не прямое действие, регулируя гемодинамику, участвуя в процессах аллергического воспаления и формировании окислительного и нитрозилирующего стрессов [2]. Метаболизм оксида азота (II) (NO) в организме человека имеет сложную компартментализацию и два альтернативных источника. Взаимодействие NO с SH-группами белков и низкомолекулярных соединений приводят к образованию S-нитрозотиолов (RSNO) - мобильного депо NO [3]. Регенерация же NO из нитратов в организме человека невозможна без участия микробной нитратредуктазы. Снижение активности эндотелиальной NO-синтазы и недостаток продукции NO (вазодилататор) ассоциируется с артериальной гипертензией (АГ) [5]. С другой стороны, NO и RSNO могут быть источниками дополнительных количеств сильных окислителей. Таким образом, определение всех упомянутых азотистых веществ в слюне может иметь как системное (эндотелиальная дисфункция, сердечно-сосудистые заболевания), так и местное (заболевания пародонта, кариозные поражения) патогенетическое значение. Известно, что у подростков высокое суммарное содержание нитратов и нитритов в слюне, полученной без стимуляции, ассоциируется с низким риском развития кариеса [4]. Относительно диагностического значения уровня RSNO слюны известно крайне мало, хотя на экспериментальной модели периодонтита показана эффективность применения препарата S-нитрозотиола глутатиона [4].

**Цель.** Определить концентрации RSNO в плазме исследуемой группы и сопоставить полученные данные с маркерами предрасположенности к



АГ, а также определить достоверность взаимосвязи между уровнем RSNO слюны и показателями системной гемодинамики, подтверждая возможность использования неинвазивной лабораторной диагностики эндотелиальной дисфункции.

**Материалы и методы.** Обследовано 2 группы лиц: первая – 29 соматически здоровых лиц в возрасте 30-35 лет обоего пола, вторая - 25 соматически здоровых лиц обоего пола в возрасте 18-25 лет. Сбор слюны проводили у второй группы исследуемых без стимуляции в дневное время после 2-3-часового голодания. Определение NO и RSNO проводили флуориметрически в проточно-инжекционной системе с использованием флуоресцентного зонда DAF-2 и S-нитрозоглутатиона в качестве калибратора [1]. Измерение артериального давления и пульса проводили утром после сна, в положении лежа. Проводился осмотр полости рта с определением индекса КПУ. Первая группа лиц была обследована аналогичным способом, за исключением осмотра ротовой полости, определение NO и RSNO проводили в плазме крови.

**Результаты и обсуждение.** Методика флуориметрического определения NO и RSNO в проточно-инжекционной системе адаптирована для исследования слюны. В исследуемой группе лиц была выявлена достоверная положительная корреляционная связь между систолическим артериальным давлением и уровнем RSNO в плазме крови ( $R_s = 0,504$ ,  $p < 0,05$ ), что подтверждает зависимость функционального состояния сосудов от уровня S-нитрозотиолов. Во второй группе исследуемых лиц выявлена достоверная отрицательная корреляция между уровнем S-нитрозотиолов в слюне и средним значением пульса ( $R_s = -0,650$ ,  $p < 0,05$ ).

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

**Список литературы**

1. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Александрова Л.А. Лабораторный образец проточной системы для экспресс-регистрации свободного оксида азота и нитрозотиолов // Бюл. ФЦСКиЭ им. В.А. Алмазова. – 2010. – № 2. – С.71.
2. Giustarini D., Milzani A., Colombo R. et al. Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. // Clin Chim Acta. – 2003. – V. 330. – P. 35-98.
3. Paulus W.J. The role of nitric oxide in the failing heart // Heart. Fail. Rev. – 2001. – Vol. 6, № 2. – P. 105–118.
4. De Menezes A.M.A., de Souza G.F.P., Gomes A.S. et al. S-nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats // Journal of Periodontology. – 2011.
5. Siervo M., Jackson S.J., Bluck L.J. In-vivo nitric oxide synthesis is reduced in obese patients with metabolic syndrome: application of a novel stable isotopic method // J Hypertens. – 2011. – V. 29, № 8. – P. 1515-1527.

И.Д. Протасова, А.М. Захарова, И.Л. Гринштейн  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ, ЖИРОРАСТВОРИМЫХ  
ВИТАМИНОВ И КАРОТИНОИДОВ В ОБЛЕПИХОВОМ МАСЛЕ,  
ФЛАВАНОИДОВ И ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ В СИРОПЕ ОТ КАШЛЯ  
МЕТОДОМ ВЭЖХ**

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

Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет

ООО «Аналит Продактс», Санкт-Петербург

[za@analit-spb.ru](mailto:za@analit-spb.ru)

**Введение.** Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – мощный инструмент исследования состава лекарственных препаратов.

**Цель.** Исследовано содержание водорастворимых, жирорастворимых витаминов, каротиноидов в облепиховом масле; флаваноидов (кемпферола и кверцетина) и фенольных кислот (кофейной и хлорогеновой) в сиропе от кашля с подорожником и мать-и-мачехой.

**Материалы и методы.** Разделение компонентов проводили на колонке с обращенной фазой. Использовали жидкостный хроматограф Шимадзу, оснащенный спектрофотометрическим детектором с возможностью программирования длин волн.

Для определения жирорастворимых витаминов (А, D<sub>3</sub>, Е) и каротиноидов, навеску пробы подвергали щелочному гидролизу при температуре 70 – 75 °С с добавлением антиоксиданта – гирохинона. Затем проводили экстракцию аналитов гексаном, который упаривали досуха на ротационном испарителе при 40 °С под вакуумом. Сухой остаток растворяли в изопропиловом спирте и подвергали хроматографическому анализу (длины волн детектирования жирорастворимых витаминов 328, 260, 280 нм). Каротиноиды хроматографировали отдельно при длине волны 450 нм. Разделение компонентов проводили в градиентном режиме, подвижная фаза: компонент А – вода, компонент В – метанол.

При анализе водорастворимых витаминов (С, РР, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>) к навеске пробы облепихового масла добавляли раствор 0,1 М соляной кислоты. Помещали в ультразвуковую баню на 10 минут, водный слой отделяли и анализировали на хроматографе (длины волн детектирования 260, 280 нм).

Разделение водорастворимых витаминов проводили в градиентном режиме, подвижная фаза: компонент А – раствор калия фосфорнокислого однозамещенного в воде с добавкой гептансульфоната натрия, компонент В – ацетонитрил.

Для определения кемпферола, кверцетина, кофейной и хлорогеновой кислот в сиропе от кашля, навеску растворяли в воде и подвергали хроматографическому анализу. Разделение проводили в изократическом режиме. Для флаваноидов подвижная фаза представляла собой смесь 0,1% водный раствор орто-фосфорной кислоты – ацетонитрил в соотношении 30:70, длина волны детектирования 370 нм. Подвижная фаза для фенольных кислот – фосфорная кислота : изопропанол : тетрагидрофуран : вода в объемном соотношении 1 : 5 : 20 : 80, соответственно. Длина волны детектирования 340 нм.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что облепиховое масло представляет собой продукт с высоким содержанием витаминов. Содержание кемпферола в сиропе от кашля составило 0,3 мг/100г, кверцетина – 0,4 мг/100 г, хлорогеновой кислоты – 3,6 мг/100 г, кофейной – 0,7 мг/100 г.

**Выводы.** Выявлено содержание важнейших компонентов в облепиховом масле и сиропе от кашля с подорожником и мать-и-мачехой.

#### Список литературы

1. Оленников Д.Н., Samuelsen A.B., Танхаева Л.М. Подорожник большой (*Plantago major* L.) химический состав и применение // Химия растительного сырья. 2007. № 2. С. 37-50.
2. Nikolova M., Gevrenova R. Determination of Phenolic Acids in Amaryllidaceae Species by High Performance Liquid Chromatography. *Pharmaceutical Biology*. 2005, V. 43, No. 3, P. 289–291.

А.В. Соболева, Ю.А. Лебедькова, П.Ю. Морозова, А.А. Колобов  
**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ  
БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ КУЛЬТУРЫ *LACTOBACILLUS  
PLANTARUM* 8PA-3**

(научные руководители – к.б.н. О.Г. Орлова, м.н.с. А.А. Колобов)

Санкт-Петербургский государственный университет

Кафедра биохимии, кафедра физиологии, лаборатория внутриклеточной регуляции

[oriselle@yandex.ru](mailto:oriselle@yandex.ru)

**Введение.** По мнению многих исследователей бактериоцины можно рассматривать в качестве потенциальных антимикробных лекарственных веществ, перспективных для последующего создания медицинских препаратов. Секвенирование ДНК промышленного пробиотического штамма *Lactobacillus plantarum* 8PA-3 выявило наличие локуса, отвечающего за синтез двух бактериоцинов.

**Цель.** Подбор штамма лактобактерий, проявляющего наивысшую антагонистическую активность в отношении большинства тест-культур. Выделение и характеристика фракций бактериоциноподобных пептидов, обладающих антимикробной активностью, из культуры *Lactobacillus plantarum* 8PA-3.

**Материалы и методы.** Отбирали клеточную культуру лактобактерий, проявляющей наивысшую антагонистическую активность. Для экстрагирования пептидов из культуры *L. plantarum* 8PA-3 использовались препаративные методы: высаливание белков раствором высокой ионной силы (40%-70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), кислотная экстракция пептидных фракций раствором 5% уксусной кислоты, центрифугирование, обессоливание и ультрафильтрация в камере фирмы «Amicon» через фильтры из регенерированной целлюлозы 10 кДа, 1 кДа. Для фракционирования группы низкомолекулярных полипептидов применяли хроматографические методы, такие как твердофазная экстракция на картридже Sep-Pak Plus, C18 фирмы «Waters» и обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография на хроматографе ÄKTAexplorer 10S фирмы «GE Healthcare» на аналитической колонке

Discovery HS C18 фирмы «Supelco» (А: 0.1% ТФУ в воде, В: ацетонитрил; градиент В от 5% до 60% за 60 мин, скорость потока 1 мл/мин). Спектр катионных пептидов по подвижности и заряду оценивали методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в кислой буферной системе в присутствии мочевины [3]. Чистоту полученных препаратов и приблизительную молекулярную массу пептидов оценивали при помощи электрофореза в 16% ПААГ в присутствии ДДС-На [5]. Для определения антимикробной активности выделенных фракций были использованы бактериологические методы: метод двухслойного агара в модифицированном варианте [1], метод радиальной диффузии белков и пептидов в агарозном геле [2] и метод наложения геля [4].

**Результаты и обсуждения.** В результате исследования антагонистической активности лактобактерий по отношению к тест-культурам *in vitro* было показано, что все исследованные штаммы подавляли рост тест-культур, о чем свидетельствовало образование зоны подавления роста. При этом клетки *L. plantarum* 8РА-3 проявляли наивысшую антагонистическую активность в отношении большинства тест-культур, в связи с чем эта культура лактобацилл признана наиболее антагонистически активной, вследствие чего и была выбрана для дальнейшей работы и выделения бактериоцинподобных пептидов. С помощью высаливания сульфатом аммония и с последующей экстракцией раствором 5% уксусной кислоты из культуральной жидкости были получены фракции супернатанта и осадка. По результатам электрофоретического разделения в 15% ПААГ в кислой буферной системе в присутствии мочевины было показано, что белковые фракции, содержащие белки с молекулярной массой более 10 кДа, обладают меньшей электрофоретической подвижностью относительно лизоцима, а белковые фракции, обладающие молекулярной массой 1-10 кДа, демонстрируют электрофоретическую подвижность схожую с лизоцимом.

По результатам электрофоретического разделения в 16% ПААГ в присутствии ДДС-На было установлено, что в пробах содержится широкий спектр белков и пептидов, схожих по молекулярной массе, отмечено преобладание белков с молекулярной массой порядка 2, 2,8, 9, 10, 20, 25, 29, 40, 72 кДа. С помощью антимикробного теста по методу радиальной диффузии, в котором использовались пробы, прошедшие твердофазную экстракцию, была показана активность белковых фракций в отношении *E. coli* и *L. monocytogenes*. Антимикробную активность против *L. monocytogenes* продемонстрировали белковые фракции, элюированные раствором 30%, 40%, 95% ацетонитрила в пробах с молекулярной массой 1-10 кДа, и фракции, элюированные раствором 20% и 30% ацетонитрила в пробах с молекулярной массой более 10 кДа. Антимикробную активность против *E. coli* показала белковая фракция с молекулярной массой более 10 кДа, элюированная раствором 95% ацетонитрила.

**Выводы.** С помощью антимикробного теста по методу двухслойного агара был отобран штамм *L. plantarum* 8РА-3, показавший наивысшую антагонистическую активность штамма в отношении большинства тест-культур, для выделения и характеристики фракций низкомолекулярных пептидов, обладающих антимикробной активностью. Методами высаливания сульфатом аммония с последующей экстракцией раствором уксусной кислоты и ультрафильтрацией были получены - проба, содержащая белки с молекулярной массой более 10 кДа и проба, содержащая низкомолекулярные белки и пептиды в диапазоне от 1 до 10 кДа. Результаты электрофореза в 16% ПААГ в присутствии ДДС-На фракции, содержащей белки с молекулярной массой более 10 кДа, показали доминирование белков с молекулярной массой порядка 10, 20, 25, 29, 40 и 72 кДа. Электрофоретическое разделение фракции, содержащей низкомолекулярные белки и пептиды в диапазоне Mr от 1 до 10 кДа, показал превалирование белков с молекулярной массой 2, 2,8 и 9 кДа. С

помощью метода электрофореза в 15% ПААГ в кислой буферной системе в присутствии мочевины было показано, что фракции, содержащие низкомолекулярные белки и пептиды в диапазоне Mr от 1 до 10 кДа, обладали средней электрофоретической подвижностью, а фракции, содержащей белки с молекулярной массой более 10 кДа, меньшей электрофоретической подвижностью относительно лизоцима. Препараты, выделенные из культуры *L. plantarum* 8РА-3, содержащие белки с молекулярной массой более 10 кДа и низкомолекулярные белки и пептиды в диапазоне от 1 до 10 кДа, обладают антимикробной активностью против грамположительных (*L. monocytogenes*) и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий. Исходя из того, что выделенная пептидная фракция обладает электрофоретической подвижностью схожей с лизоцимом, то есть положительно заряжена, включает низкомолекулярные пептиды, демонстрирует большую антагонистическую активность в отношении грамположительных бактерий, можно предположить, что в полученных пробах содержатся пептиды, принадлежащие к бактериоцинам.

#### Список литературы

1. Ермоленко Е.И., Исаков В.А., Ждан-Пушкина С.Х., Тец В.В. Количественная характеристика антагонистической активности лактобацилл. // Микробиол. 2004. №5. С.94-98.
2. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S., Jackson R., Eisenhauer P. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. // J. Immun. Meth. 1991. V. 137. P. 167-173.
3. Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. // Arch. Biochem. Bioph. 1969. V. 130. № 2. P. 337-346.
4. Porter E.M., van Dam E., Valore E.V., Ganz T. Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. // Inf. Immun. 1997. V. 65. P. 2396-2401.
5. Schägger H., von Jagow G. Tricine – sodium dodecylsulphate – polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. // Anal. Bioch. 1987. V. 166. P. 368-379.



С.Е. Фатеева  
**ХАРАКТЕРИСТИКА КАТИОННЫХ ФРАКЦИЙ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ  
СЫВОРОТКИ ЗРЕЛОГО МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА**

(научный руководитель – к.б.н., доц. Л.Е. Леонова)  
Санкт-Петербургский государственный университет  
Кафедра биохимии

[fateewasveta@yandex.ru](mailto:fateewasveta@yandex.ru)

**Введение.** Изучение антимикробных свойств минорных белков и пептидов молока человека необходимо для понимания роли грудного вскармливания в становлении иммунитета детей первого года жизни.

**Цель.** Выявить катионные фракции сыворотки молока человека, обладающие наибольшей антимикробной активностью против грамположительных, грамотрицательных тестовых бактерий и грибов.

**Материалы и методы.** В исследовании использовали сыворотку зрелого молока добровольного здорового донора. Сыворотка молока была сконцентрирована методом ультрафильтрации и подвергнута препаративному электрофорезу в кислой среде в присутствии мочевины. Полученные фракции катионных белков и пептидов сыворотки молока были проанализированы методом аналитического электрофореза в кислой среде и в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия. Определена антимикробная и антигрибковая активность. Определена активность лизоцима методом радиальной диффузии (субстрат *Micrococcus lysodeikticus*).

**Результаты.** В результате исследования выявлены катионные белковые фракции обладающие антимикробной активностью против грамположительных (*L. monocytogenes*), грамотрицательных (*E.coli*) тестовых бактерий и грибов (*C.albicans*).

**Выводы.** Наибольшей антимикробной активностью обладает наиболее подвижная катионная фракция, содержащая лизоцим.



ИЛ-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ . Установлена патогенетическая связь этих показателей и степени тяжести церебральной патологии (дисциркуляторная энцефалопатия, инсульт, болезнь Альцгеймера, эпилептогенные судороги, локальное термическое повреждение мозга, синдром хронической усталости). Прямыми последствиями митохондриальной дисфункции являются, формирование свободных радикалов, нарушение антиоксидантной защиты, глутаматная эксайтотоксичность и нейроапоптоз.

**Вывод.** При церебральных патологиях различного генеза дисфункция митохондрий является важным патогенетическим фактором, реализующимся, в конечном итоге, в форме нейроапоптоза.

А.Ф. Янкова  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНСНЫХ ПРЕДЕЛОВ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВЫСШИХ  
ОКИСЛОВ АЗОТА В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ  
ВОЗРАСТА И ПОЛА**

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

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

Отдел биохимии НИЦ

[annushkavolgmu@yandex.ru](mailto:annushkavolgmu@yandex.ru)

**Введение.** Определение концентрации высших окислов азота имеет важное клиническое значение при патологии сердечно-сосудистой системы. Золотым стандартом определения является цветная реакция с реактивом Грисса. В реакцию Грисса вступают только нитриты, поэтому проблемой является поиск оптимального способа предварительного восстановления нитратов до нитритов. До последнего времени наиболее применяемым методом являлось восстановление металлами. Однако, как и любой другой гетерогенный катализ, эта методика плохо воспроизводима. Более надежным является восстановление за счет коммерческой рекомбинантной нитратредуктазы.

**Цель.** Разработка модификации методики определения высших окислов азота с использованием нитратредуктазы в качестве восстановителя и определение референсных значений у лиц разного возраста и пола.

**Материалы и методы.** В исследование были включены образцы плазмы крови 76 доноров: 19 мужчин в возрасте 30-39 лет, 12 мужчин – 40-60 лет, 27 женщин в возрасте 30-39 лет, 18 женщин – 40-60 лет. В работе использовали рекомбинантную нитратредуктазу растительного происхождения из *Arabidopsis thaliana* (Sigma). Полного восстановления нитратов достигали путем 60-минутной инкубации пробы и фермента в присутствии 250 мкМ НАДН в фосфатном буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА, рН 6,9. Для фотометрирования использовали проточную микрокювету объемом 10 мкл. Это позволило свести к минимуму расход фермента.

**Результаты и обсуждения.** В группе молодых мужчин (30-39 лет) среднее значение концентрации суммы окислов азота составляет 18,86 мкМ, межквартильный размах – 11,8-23,7 мкМ. Это достоверно не отличается от обеих возрастных групп женщин. Среднее значение в группе женщин 30-39 лет- 18,44 мкМ (межквартильный размах – 7,5-26,3 мкМ), 40-61 лет- 16,85 мкМ (межквартильный размах- 11,2-21,8 мкМ). Значимые отличия в возрастном аспекте ( $p=0,043$ ) наблюдаются в группе мужчин: в возрасте 40 – 61 лет среднее значение составляет 26,38 мкМ (межквартильный размах – 19,8-33,05 мкМ).

**Вывод.** Обнаружены достоверно значимые отличия в концентрациях высших окислов азота в группах мужчин (30-39 лет и 40-61 лет). Наблюдается тенденция к нарастанию концентрации с возрастом. Подобной аналогии в группах женщин того же возрастного диапазона не установлено.

Научное издание

Всероссийская V-я научная конференция  
**«Труды секции клинической  
биохимии»**

Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2013 года

Бюллетень

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

---