

Министерство образования Республики Беларусь
Белорусский государственный университет
Биологический факультет
Кафедра биохимии

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

_____ Семак И.В.

«16» марта 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

_____ Демидчик В.В.

«24» марта 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Председатель

учебно-методической комиссии факультета

_____ Поликсенова В.Д.

«24» марта 2022 г.

Прикладная биохимия

Электронный учебно-методический комплекс
для специальности: 1-31 80 11 «Биохимия»

Регистрационный № 2.4.2-20/230

Автор:

Новиков Д.А., кандидат биологических наук, доцент

Рассмотрено и утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ
18.03.2022 г., протокол № 4.

Минск 2022

УДК 577.1.087(075.8)
Н 731

Утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ
Протокол № 4 от 18.03.2022 г.

Решение о депонировании вынес:
Совет биологического факультета
Протокол № 8 от 24 марта 2022 г.

А в т о р:

Новиков Дмитрий Алексеевич, кандидат биологических наук,
доцент кафедры биохимии факультета биологии БГУ.

Рецензенты:

кафедра физиологии и биохимии Учреждения образования «Белорусский государственный университет физической культуры» (заведующий кафедрой Рубчентя И. Н., кандидат биологических наук, доцент);

Янцевич А. В., заместитель директора по науке ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ», кандидат химических наук, доцент.

Новиков, Д. А. Прикладная биохимия: электронный учебно-методический комплекс для специальности: 1-31 80 11 «Биохимия» / Д. А. Новиков ; БГУ, Биологический фак., Каф. биохимии. – Минск : БГУ, 2022. – 172 с. : ил. – Библиогр.: с. 171–172.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 80 11 «Биохимия». Содержание ЭУМК предполагает формирование и развитие у магистрантов представлений о методах современной биохимии, получивших широкое применение в различных областях производства, медицины, судебной экспертизы. Формирование навыков самостоятельного проведения аналитических исследований с использованием современных методов биохимии. Дисциплиной предусмотрено выполнение практических работ, направленных на овладение комплексом знаний и умений для решения научных и прикладных задач в области прикладной биохимии.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА.....	4
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....	5
КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ.....	5
1.1. Введение в прикладную биохимию.	5
1.2. Современные биохимические методы, применяемые для решения прикладных вопросов различных отраслей народного хозяйства.	12
1.3. Практическое использование ЯМР-спектроскопии и ЭПР-спектроскопии.	21
1.4. Практическое применение методов протеомного анализа. Электрофорез..	28
1.5. Практическое применение хроматографических методов.	39
1.6. Практическое применение масс-спектрометрии.	48
1.7. Полимеразная цепная реакция в реальном времени и ее практическое применение.	58
1.8. Классическое секвенирование. Секвенирование нового поколения.	68
1.9. Прикладная биохимия в судебной практике.	76
1.10. Биосенсорная техника: современное состояние и перспективы.	89
1.11. Практическое использование биохимии в спорте.	97
1.12. Биохимические подходы в фармацевтике.	124
1.13. Биохимические подходы в клинической практике.....	150
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....	155
Практическая работа.	155
Практическая работа. Выявление нарушений обмена веществ у лабораторных крыс с экспериментальными патологиями посредством анализа общепринятых клинических маркеров сыворотки крови.....	155
3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.....	166
3.1. Перечень контрольных мероприятий управляемой самостоятельной работы студентов.....	166
3.2. Методика формирования оценки.....	166
3.3. Темы рефератов.....	166
3.4. Примеры тестов и задач.....	167
3.5. Вопросы для подготовки к экзамену.....	168
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ.....	171
4.1. Рекомендуемая литература.	171
4.2. Электронные ресурсы.....	172

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Прикладная Биохимия» создан в соответствии с требованиями Положения об учебно-методическом комплексе на уровне II ступени высшего образования и предназначен для студентов специальности 1-31 80 11 «Биохимия».

Содержание разделов ЭУМК соответствует образовательным стандартам высшего образования данной специальности.

Цель ЭУМК – оказание методической помощи студентам магистратуры в систематизации учебного материала в процессе подготовки к итоговой аттестации по дисциплине специализации «Прикладная биохимия».

В структуру ЭУМК входит:

1. Теоретический раздел (включает конспект лекций).
2. Практический раздел.
3. Контроль самостоятельной работы студентов (содержит перечень контрольных мероприятий управляемой самостоятельной работы студентов; методику формирования оценки; темы рефератов; примеры тестов и задач; вопросы для подготовки к экзамену).
4. Вспомогательный раздел (включает учебно-программные материалы и список рекомендуемой литературы).

Работа студента с ЭУМК должна включать ознакомление с тематическим планом учебной дисциплины, представленным в учебной программе учреждения высшего образования, в которой можно получить информацию о тематике лекций и практических занятий, перечнях рассматриваемых вопросов и рекомендуемой для их изучения литературы. Для подготовки к практическим занятиям и промежуточным зачетам рекомендуется использовать материалы, представленные в теоретическом и практическом разделах УМК, а также материалы для контроля самостоятельной работы студентов. В ходе подготовки к экзамену целесообразно ознакомиться с требованиями к компетенциям по учебной дисциплине, изложенными в учебной программе учреждения высшего образования, а также перечнем вопросов к экзамену. Для написания рефератов (презентаций) могут быть использованы информационно-аналитические материалы, указанные в соответствующем разделе ЭУМК.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1. Введение в прикладную биохимию.

Биохимия – наука, о молекулярных основах жизни. Она изучает химический состав организма и биохимические процессы, лежащие в основе его жизнедеятельности. Биохимия является частью биологии. Охватывает те области биологии, которые требуют физико-химических и химических подходов, приемов и методов для изучения процессов, протекающих в живых организмах.

Раздел, изучающий состав живых организмов и свойства химических соединений, выделенных из живых тканей, называется *статической биохимией*. Все многообразие химических реакций в организме, их взаимосвязь и регуляция, а также сопряженные с ними превращения энергии в процессах жизнедеятельности изучаются динамической биохимией. Биохимические процессы, лежащие в основе жизнедеятельности отдельных тканей и органов и проявления их специфической функции, рассматриваются различными разделами *функциональной биохимии*.

Специальным разделом функциональной биохимии является *биохимия спорта*, которая подробно изучает химический состав и процессы обмена веществ в мышечной ткани, а также ряд специальных вопросов: биохимические основы построения спортивной тренировки, обеспечение энергией мышечной работы различной мощности и продолжительности, биохимические основы утомления и восстановления организма после мышечной деятельности. Биохимический контроль в спорте позволяет выявить влияние на организм человека как отдельных тренировочных упражнений, так и всей системы тренировки в целом.

В подготовке высококвалифицированных специалистов в области физической культуры учебная дисциплина «Биохимия» играет важную роль. Тренер, преподаватель физического воспитания в полной мере должен владеть знаниями о биохимических процессах, лежащих в основе жизнедеятельности организма. Знать особенности обмена веществ во время физической работы и отдыха, чтобы грамотно построить тренировочный процесс. Оценить соответствие физических нагрузок функциональному состоянию спортсмена. Разработать новые методы и средства повышения спортивной работоспособности, развития двигательных качеств, восстановления после нагрузки.

Биохимия и фармацевтическое производство. Перспективы развития фармацевтической технологии тесно связаны с влиянием научно-технического прогресса. На базе новейших научных открытий создаются принципиально

новые, более совершенные и производительные технологические процессы, резко увеличивающие производительность труда и повышающие качество готовой продукции.

Технология оказывает значительное влияние на будущие экономические показатели производства, требует разработки малооперационных, ресурсосберегающих и безотходных процессов, их максимальной механизации, автоматизации и компьютеризации.

Для прогнозирования и оптимизации технологических процессов успешно применяется математическое планирование эксперимента, прочно вошедшее в технологическую науку и практику. Этот метод позволяет получать математические модели, связывающие параметр оптимизации с влияющими на него факторами, и дает возможность без длительного процесса выявлять их оптимальные технологические режимы.

Таким образом, технологии получили новые современные методы определения оптимальных конечных результатов с наименьшими затратами, что является наглядным примером того, как наука превращается в непосредственную производительную силу.

В результате возросшей роли и возможностей технологии необычно сокращаются сроки от возникновения идеи, первых результатов научных исследований до их реализации в промышленном производстве.

Перспективы развития фармацевтической технологии определяются требованиями современной фармакотерапии, которые предполагают создание максимально эффективных с лечебной точки зрения лекарственных препаратов при содержании в них минимума лекарственных субстанций, не обладающих побочными действиями. В основе решения этой задачи лежат положения и принципы биофармации, базирующиеся на оптимальном подборе состава и вида лекарственной формы и использовании оптимальных технологических процессов. Этим объясняется широкое распространение и углубление биофармацевтических исследований во многих странах.

Однако изучение биофармацевтических аспектов получения и назначения лекарственных препаратов, изучение "судьбы" лекарственных средств в организме — это лишь первый этап решения сформулированной выше задачи. Дальнейшие усилия должны быть направлены на реализацию полученных сведений в процессе производства и применения лекарственных препаратов с целью ликвидации таких их недостатков, как короткий срок действия; неравномерное поступление лекарственных веществ в патологический очаг; отсутствие избирательного действия; недостаточная стабильность и др.

Лишь те лекарства могут считаться рациональными, которые обеспечивают оптимальную биологическую доступность действующих веществ. Следовательно, к современным лекарствам могут относиться и традиционные, например, таблетки, мази, суппозитории и др., если они обеспечивают рациональную фармакотерапию.

К первоочередным задачам фармацевтической технологии следует отнести повышение растворимости труднорастворимых лекарственных веществ в воде и липидах; увеличение стабильности гомогенных и гетерогенных лекарственных систем; продление времени действия лекарственных препаратов; создание лекарств направленного действия с заданными фармакологическими свойствами.

Совершенствование регулируемости и направленности действия биологически активных веществ является основным направлением в развитии фармацевтической технологии. Разработанные лекарственные системы с регулируемым высвобождением действующих веществ позволяют быстро достичь лечебного эффекта, длительно удерживать постоянный уровень их терапевтической концентрации в плазме крови. Как показала практика, использование таких лекарственных систем дает возможность уменьшить курсовую дозу, устранить раздражающее действие и передозировку лекарственных веществ, уменьшить частоту проявлений побочных эффектов.

Особого внимания заслуживают так называемые терапевтические системы для перорального и трансдермального применения, номенклатура которых во многих странах с каждым годом расширяется.

Наиболее перспективны в области современной фармакотерапии терапевтические системы с направленной доставкой лекарственных веществ к органам, тканям или клеткам. Направленная доставка позволяет значительно снизить токсичность лекарственных веществ и экономно их расходовать. Около 90% лекарственных веществ, применяемых в настоящее время, не достигает цели, что свидетельствует об актуальности данного направления в фармацевтической технологии.

Терапевтические системы с направленной доставкой лекарственных веществ принято подразделять на три группы:

- носители лекарственных веществ первого поколения (микрокапсулы, микросферы) предназначены для внутрисосудистого введения вблизи определенного органа или ткани;

- носители лекарственных веществ второго поколения (нанокапсулы, липосомы) размером менее 1 мкм объединяются в одну группу под названием коллоидных носителей. Они распределяются преимущественно в селезенке и печени — тканях, богатых клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Разработаны методы получения нанокапсул с фенобарбиталом, диазепамом, преднизолоном, инсулином, простагландинами; наносфер с цитостатиками, кортикостероидами; изучаются липосомы для доставки ферментов, хелатирующих и химиотерапевтических, противовоспалительных, противовирусных и белковой природы (инсулина) веществ;

- носители лекарственных веществ третьего поколения (антитела, гликопротеиды) открывают новые возможности обеспечения высокого уровня избирательного действия и направленной их доставки.

Для транспорта и локальной доставки лекарственных веществ к органу-мишени могут быть использованы магнитоуправляемые системы. Создавая в органе депо лекарственного вещества, они могут пролонгировать его действие.

Судебная биохимия. Предметом медико-криминалистической экспертизы является установление и оценка фактов (признаков), для выявления которых требуется помимо специальных познаний в области судебной медицины применение различных лабораторных методов исследования (физических, технических, химических, математических и др.).

Провести границу между разными видами криминалистических экспертиз иногда бывает очень сложно, так как объекты исследования могут объединять в себе, в зависимости от условий и ситуаций, несколько качеств и свойств. Для демонстрации этого возьмем простой пример. На месте преступления обнаружены следы крови. Какой вид экспертизы можно назначить? Возможно, вы скажете: *«Если нужно узнать, чей это след крови, то, конечно, следует назначить молекулярно-генетическую экспертизу!»*. А если мы добавим, что это отпечаток окровавленного пальца? Наверное, вы уточните: *«Тогда нужно провести дактилоскопическое исследование»*. А если этот отпечаток окровавленного пальца оставлен на коже убитого человека? Кто должен проводить экспертизу? *«Возможно, судебно-медицинский эксперт?»* — решите вы... Но те же следы крови, если они остались на месте происшествия, могут являться объектом трасологических исследований (когда изучаются следы механического воздействия). При этом эксперты-трасологи будут воспринимать следы крови не как отметки биологического происхождения, а всего лишь как краситель, оставшийся на каком-либо исследуемом объекте.

Переходя к перечислению и попытке классификации, мы остановимся на различиях в целях назначения экспертиз. К ним относятся: 1) реконструкция событий и 2) вопросы идентификации. Чтобы объяснить, что мы имеем в виду, вернемся к примеру, с окровавленным отпечатком пальца.

Допустим, мы нашли талантливого универсального эксперта-криминалиста, который может провести любые виды исследований и вытянуть из этого следа максимум информации. Он составил заключение эксперта на 120 листах и ответил на все наши вопросы. При этом все его ответы можно разделить на две части: первая часть будет описывать и реконструировать условия, при которых остался этот окровавленный след, а вторая часть будет сосредоточена на том, чья кровь обнаружена в этом следе и чьим пальцем он оставлен.

Таким образом, используя эту логику и реконструируя обстоятельства происшествия, криминалист в своей работе как бы возвращается на место событий и проводит анализ того, что же произошло. Идентификационные же исследования занимаются изучением как объектов биологического происхождения (человека или его следов, например, отпечатков пальцев, — это так называемая биометрическая идентификация), так и небιологического, и

позволяют собрать информацию как об орудии преступления, так и о возможном преступнике.

Клиническая биохимия - которая изучает изменение химического состава и обмена веществ в организме человека в динамике течения патологического состояния и их лечения, а также разрабатывает методы биохимического выявления этих изменений в целях диагностики и прогноза эффективности воздействий. *Главная задача клинической биохимии* – обеспечить врача информацией, необходимой для лечения больного. Биохимические анализы используются в тех случаях, когда заболевание имеет очевидную метаболическую основу (сахарный диабет, гипотиреоз) или когда биохимические изменения являются следствием заболевания (почечная недостаточность, мальабсорбция). *Биохимические тесты используются для* диагностики, прогноза, мониторинга и скрининга состояния пациента.

Наиболее широко в клинической биохимии используются следующие *физико-химические методы анализа*:

1. поляриметрия, в основе которой лежит свойство прозрачных растворов веществ вращать плоскость поляризованного света (определение глюкозы в моче).

2. адсорбционная фотометрия, основанная на способности веществ избирательно поглощать свет определенных длин волн (более 80% используемых в клинической практике методов).

3. нефелометрия – вид оптического анализа, в основе которого лежит измерение светового потока, рассеиваемого в направлении, почти перпендикулярном направлению его падающего пучка (используется редко). Турбидиметрия – разновидность нефелометрии, при использовании которой частичная непрозрачность анализируемой среды измеряется путем оценки снижения интенсивности падающего светового потока. Поглощение монохроматического света происходит в случае, если длина волны электромагнитного излучения оказывается значительно меньше, чем размеры частиц. Все определяемые данным методом вещества представляют собой белки, содержащиеся в плазме (сыворотке) крови в относительно большом количестве (альбумин, апопротеины, факторы гуморального иммунитета, белки “острой фазы”).

4. флуориметрия – измерение концентрации вещества по интенсивности его флуоресценции. Используется для определения липопротеинов различной плотности, гистамина, катехоламинов, витаминов, активности аминотрансфераз.

5. пламенная фотометрия используется для определения в биологических жидкостях ионов калия, натрия, а также других элементов, атомы которых способны возбуждаться и испускать свечение в высокотемпературном пламени газовой горелки.

6. иммуноферментный анализ позволяет определять содержание гормонов, онкомаркеров, факторов гуморального и клеточного иммунитета.

7. ионометрия (потенциометрия) основана на определении электрохимического потенциала ионселективного электрода, погруженного в исследуемый раствор (рН, концентрации ионов натрия, калия, хлора).

8. радиоиммунный анализ ограничено используется для определения тиреоидных гормонов, тиреоглобулина, кортизола, эстрадиола, прогестерона, пролактина, тестостерона, ферритина, плацентарного лактогена, раково-эмбрионального антигена.

9. электрофорез (используется для построения протеинограмм).

10. хроматография (часто высокоэффективная жидкостная) применяется для определения катехоламинов и их метаболитов, серотонина, гистамина, простагландинов, стероидов, аминокислот, нефропептидов, опиатов, барбитуратов, гербицидов и др.

11. методы “сухой химии”. Реализуются с применением специальных тест-полосок, реагентные зоны которых содержат сухие реактивы (ферменты и /или не ферменты), способные реагировать с определенными соединениями биологических жидкостей с изменением окраски индикаторной зоны. Используются для определения содержания билирубина, кетоновых тел, белка, глюкозы, аскорбиновой кислоты, нитритов, величины рН и др.).

Виды биологического материала, условия его взятия, хранения и транспортировки для лабораторных исследований.

В настоящее время наиболее широко используемыми видами биологического материала для клинических исследований являются кровь (цельная кровь, сыворотка и плазма крови) и моча.

Кровь рекомендуется брать утром (между 8 и 10 часами), до физической нагрузки и проведения диагностических процедур. За сутки до взятия крови прием пищи должен быть обычным (следует исключить алкоголь). Накануне проведения анализа (после 2 часов ночи) запрещается курение, прием пищи и жидкости. Непосредственно перед взятием крови пациенту необходимо находиться в положении сидя в течение не менее 15-30 минут. Положение тела оказывает влияние на концентрацию общего белка, альбумина, креатина, холестерина, триацилглицеринов, активность щелочной фосфатазы, аспартатаминотрансферазы и др. Содержание этих веществ и активность ферментов значительно повышаются при переходе в вертикальное положение и уменьшается в горизонтальном.

При взятии крови методом венопункции не следует сжимать и разжимать пальцы руки, так как это вызывает местный стаз и гипоксию, а также сдвиги в распределении некоторых веществ (холестерол, ионы калия, натрия, кальция) между форменными элементами крови и ее жидкой частью.

При заборе крови следует избегать гемолиза, так как он вызывает повышение в плазме (сыворотке) крови концентраций веществ и активности ферментов, содержание которых в эритроцитах велико.

Использование антикоагулянтов для получения плазмы также может стать источником ошибок, так, использование ЭДТА и цитрата натрия мешает определению активности α -амилазы, гепарината лития – активности щелочной фосфатазы, оксалата натрия – рН крови, содержания ряда электролитов (калия, натрия, кальция), активности α -амилазы и щелочной фосфатазы.

Для получения сыворотки крови антикоагулянт не добавляют. Сыворотку желателно использовать для лабораторных исследований в день взятия крови, иначе ее необходимо хранить при 0-4 °С. Хранение допускается и в течение месяца при условии ее замораживания сразу после получения и 1-кратном размораживании непосредственно перед определением. Для определения содержания лабильных соединений, активности некоторых ферментов (кислая фосфатаза) необходимо пользоваться только свежей сывороткой.

Помимо этого, для ряда анализов может быть использована *слюна* (активность α -амилазы, содержание хлорида, мочевины, альдостерона, кортизола). Этот способ, в отличие от классического, исключает болезненный этап получения плазмы и предотвращает вызываемые эмоционально-болевым стрессом искажения в гормональном статусе организма, создавая широкие перспективы для проведения психо-физиологических исследований.

Большое значение имеет исследование экскретов потовых – на содержание ионов хлора (главным образом, для диагностики муковисцидоза) и солевых желез. Так, Н.А. Манакон, использовавшим метод получения отпечатков кожи на фильтровальной бумаге, установлено, что у больных ревматизмом и ишемической болезнью сердца происходят характерные сдвиги в составе липидов, экскретируемых солевыми железами кожи.

Для диагностики отдельных форм патологии сердечно-сосудистой системы могут быть использованы волосы. Рядом исследователей установлено, что концентрация ионов кальция в них при инфаркте миокарда снижается почти в 10 раз.

Для количественной характеристики диагностической надежности и значимости лабораторного теста используются следующие критерии:

- 1) диагностическая чувствительность,
- 2) диагностическая специфичность,
- 3) диагностическая эффективность,
- 4) предсказательная ценность отрицательного результата теста,
- 5) предсказательная ценность положительного результата теста,
- 6) коэффициент соотношения истинных и ложных положительных и отрицательных результатов.

О *диагностической чувствительности* судят по доле (%) положительных результатов анализа у пациентов с соответствующим заболеванием. О *диагностической специфичности* – по доле (%) отрицательных результатов у лиц, не страдающих соответствующим заболеванием. *Диагностическая эффективность* (%) определяется как число правильных результатов, деленное на общее число выполненных анализов. *Предсказательная ценность*

положительного результата теста (в %) – вероятность того, что у пациента с положительным результатом теста есть заболевание. *Предсказательная ценность отрицательного результата теста (в %)* – вероятность того, что у пациента с отрицательным результатом теста нет заболевания.

Определенное значение имеет установление *коэффициента соотношения истинных и ложных положительных и отрицательных результатов*. Чем выше коэффициент, тем информативнее тест. В идеальном случае, эти коэффициенты должны быть равны абсолютной величине истинно положительных и истинно отрицательных результатов, соответственно.

Среди факторов, способных вызвать отклонение результатов от истинных показателей содержания исследуемых веществ (либо активности ферментов), выделяют внутри- и внелабораторные.

Внелабораторные (доаналитические) ошибки вызываются суточными и сезонными колебаниями концентрации метаболитов в биологических жидкостях, индивидуальными, возрастными, половыми особенностями, характером питания, эмоциональной лабильностью пациентов, влиянием физической активности.

К внелабораторным ошибкам определения приводит прием пациентами лекарственных препаратов, большинство которых имеет побочные эффекты на организм, отражаемые характерными изменениями лабораторных показателей. Например, салицилаты, как правило, вызывают возрастание активности аминотрансфераз плазмы крови. На результаты лабораторных исследований могут оказывать влияние не только лекарственные вещества, но также промежуточные или конечные продукты их метаболизма (например, метаболиты пенициллина ложно повышают значения концентрации белка в моче).

Внутрилабораторные ошибки связаны с ошибками пробоподготовки и погрешностями приборных замеров.

1.2. Современные биохимические методы, применяемые для решения прикладных вопросов различных отраслей народного хозяйства.

Физико-химические методы изучения макромолекул

Основной задачей биофизики, биохимии, молекулярной биологии, генетики и ряд других смежных дисциплин является изучение живых систем на молекулярном уровне. Решение этой задачи невозможно без использования самых разных методов физико-химической биологии. В современной биологии используется большое количество физических, химических, математических методов исследований. В последние годы разработаны сложные физико-химические методы, позволяющие детально охарактеризовать биологические системы, в т.ч. на молекулярном уровне. В этой лекции дается обзор наиболее широко используемых в биологических исследованиях физико-химических методов.

Спектроскопические методы. Абсорбционная спектрофотометрия.

Для исследования свойств биологических систем и макромолекул широко применяют различные спектроскопические (спектральные, оптические) методы, т.е. методы, основанные на взаимодействии молекул со светом. Оптические методы используются для изучения стационарных характеристик биологических объектов, когда за время измерения не происходит изменений регистрируемых параметров. Они также используются для измерения и динамических параметров, изменяющихся во времени в процессе их регистрации, вследствие протекания в системе нестационарных процессов.

Световая (электромагнитная) волна представляет собой колебания электрического и магнитного полей во взаимно перпендикулярных плоскостях, амплитуды колебания которых по мере распространения волны изменяются по синусоиде. Энергия волны

$$E = hc/\lambda = hn,$$

где h - постоянная Планка, c - скорость света, λ - длина волны, n - частота волны.

Когда световая волна сталкивается с молекулой, она может либо преломляться (т.е. изменять направление распространения), либо поглощаться (т.е. энергия волны передается молекуле). Относительная вероятность протекания того или иного процесса является свойством той молекулы, с которой произошло столкновение. Если произошло поглощение электромагнитной энергии, о молекуле говорят, что она возбуждена или перешла в возбужденное состояние. Поглощение и излучение энергии световой волны происходит определенными порциями, квантами. Интенсивность излучения светового потока $I = nE$ (n - число квантов в световом потоке). Энергия кванта связана с длиной волны (нм) следующими соотношениями: $E_{Дж} = 1,2 \cdot 10^8/\lambda$, $E_{эВ} = 1234/\lambda$, где $E_{Дж}$ выражена Дж/моль, $E_{эВ}$ - в электрон-вольтах.

Молекула или часть молекулы, которая может быть возбуждена при поглощении света в видимой области или УФ-области, называется хромофором. В основном, энергия возбуждения превращается в тепло (кинетическую энергию) в результате столкновения возбужденной молекулы с другой молекулой (например, с молекулой растворителя). При возбуждении некоторых типов молекул поглощенная энергия света вновь излучается в виде фотонов (флуоресценция). В любом случае, интенсивность света, прошедшего через молекулу, содержащую набор хромофоров, меньше интенсивности падающего света. Как известно, молекула (атом) характеризуется набором квантованных энергетических состояний, описываемых законами квантовой механики. Эти состояния называют энергетическими уровнями молекул (атомов). Главный энергетический уровень определяется возможным пространственным распределением электронов и называется электронным энергетическим уровнем. Внутри главного уровня находятся колебательные уровни, характеризующие изменение движения электронов. Колебательные

уровни указывают на различные типы колебаний молекул (изменение угла связей, длины связей). Энергетические уровни молекул обычно изображают схемой энергетических уровней. Самый низкий электронный уровень называют основным состоянием молекулы (атома), а все другие – возбужденными состояниями.

Наибольшая вероятность поглощения энергии электромагнитной волны имеет место в случае, если эта энергия соответствует разности энергий квантованных состояний молекулы. Электромагнитная волна (свет) с длиной волны l поглощается в том случае, если

$$l = hc/E_2 - E_1,$$

где E_1 - значение энергии молекулы до возбуждения (основной энергетический уровень), E_2 - значение энергии возбужденной молекулы (после поглощения энергии электромагнитной волны).

Изменение энергетического состояния молекулы при поглощении (или испускании) энергии света называется переходом. Переход между электронными уровнями соответствует энергии, необходимой для перемещения электрона с одного уровня на другой. При переходе электрона на более высокий энергетический уровень энергия поглощается, при переходе на более низкий уровень – энергия излучается. Зависимость между поглощением энергии молекулой от длины волны падающего света называется спектром поглощения. Поскольку возможны переходы с основного состояния на любой колебательный или вращательные уровни, то спектр поглощения молекулы выглядит в виде относительно плавной кривой. Каждый тип молекул характеризуется своим, присущим только этой молекуле, спектром поглощения. Для большинства биологических молекул, длины волн, соответствующие переходам между основным состоянием и любым колебательным уровнем первого возбужденного состояния, лежат в ультрафиолетовой и видимой части спектра (102 -103 нм). Возможны также переходы между колебательными уровнями в пределах одного электронного уровня. Такие переходы имеют место в результате поглощения излучения в инфракрасной области спектра (103 – 105 нм). Переходы на вращательном уровне (изменения спина электрона) происходят в области радиочастотного спектра электромагнитных волн (>105 нм).

Вероятность поглощения света определенной длины волны молекулами характеризуется молярным коэффициентом поглощения (погашения, экстинкции) e . Если световой поток с интенсивностью I_0 проходит через раствор с толщиной слоя d и концентрацией молекул c , то интенсивность прошедшего через раствор света I подчиняется закону Ламберта-Бэра

$$I = I_0 \times 10^{-edc}$$

или

$$\lg I/I_0 = -e \times dc$$

или

$$\lg I_0/I = e \times dc,$$

где I – интенсивность света (энергия на единицу площади в единицу времени), Дж \times м² \times с; ϵ - молярный коэффициент поглощения (погашения, экстинкции), характеризует вероятность перехода молекулы из одного энергетического состояния в другое при поглощении или испускании кванта света;

d - толщина слоя раствора (длина кюветы), см;

c - концентрация вещества, моль/л.

Результаты измерений выражают либо как процент пропускания, либо как поглощение. Когда $d = 1$ см, A называют оптической плотностью $Dl = \epsilon c$. Индекс l указывает на длину волны, при которой проводится измерение. При высоких концентрациях вещества в растворе могут иметь место отклонения от закона Ламберта-Бэра. Это может происходить вследствие рассеяния света, структурных изменений молекул (например, при димеризации, агрегации молекул). Высокие концентрации веществ в растворе могут стимулировать и химические изменения молекул. Поэтому при спектрофотометрическом определении концентрации вещества в растворе, нужно убедиться в соблюдении этого закона в исследуемом интервале концентраций. Например, в случае соблюдения закона, разбавление исследуемого раствора в 2 раза, должно привести к уменьшению значения Dl тоже в 2 раза.

Измерение поглощения света осуществляется при помощи спектрофотометров или фотокolorиметров. Несмотря на различия в конструкции, все спектрофотометры состоят из источника света (1), монохроматора (2), стеклянной кюветы (3), куда помещается исследуемый образец, детектора света (4) и измерительного прибора (5). Ход работы обычно следующий. Прибор настраивают таким образом, чтобы он показывал нулевое значение при измерении поглощения растворителя, в котором растворено исследуемое вещество. Затем можно снимать показания, соответствующие непосредственно поглощению образца. Для получения спектра поглощения операция повторяется при различных длинах волн.

Абсорбционная спектрофотометрия широко используется для определения концентрации вещества, анализа химических реакций, идентификации веществ, определения структурных параметров макромолекул.

Определение концентрации растворов проводят непосредственно измерением оптической плотности, если известен ϵ и соблюдается закон Ламберта-Бэра. В большинстве случаев для определения концентрации используют калибровочные графики, составленные по известным концентрациям.

Исследование биохимических реакций. Скорость реакции, активность ферментов можно измерить по уменьшению концентрации субстрата или по повышению концентрации продукта реакции в реакционной смеси.

Идентификация веществ путем спектральных измерений. Большинство соединений имеют характерные спектры поглощения и могут быть

идентифицированы с их помощью. Для этих целей используются автоматические регистрирующие спектрофотометры.

Исследование процессов денатурации и ренатурации ДНК. При денатурации ДНК его оптическая плотность D_{260} , при ренатурации – понижается

Инфракрасная спектрофотометрия

При поглощении света в ИК-области спектра (103 – 105 нм) происходят переходы между колебательными уровнями основного состояния молекулы. Спектр поглощения инфракрасного света возникает за счет характеристических движений (изменение длины, величины угла связей) различных функциональных групп (например, метильной, амидной, карбонильной и т.д.). Колебательные спектры очень чувствительны к изменениям химической структуры, конформации, окружения молекулы. В этом смысле инфракрасная спектроскопия не отличается от спектрофотометрии в видимом и ультрафиолетовом свете. И сами ИК-спектрофотометры принципиально не отличаются спектрофотометров, работающих в области видимого и ультрафиолетового света. Этот метод рассматривается отдельно ввиду того, что имеются некоторые отличия методологического характера.

ИК-спектрофотометр состоит из источника излучений (металлический стержень, нагретый до 1800 – 2000 С, монохроматора, кюветной камеры с кюветой, детектора излучений (термопара). Главная трудность использования ИК-спектрофотометра для характеристики макромолекул состоит в том, что нельзя использовать их водные растворы. Вода имеет очень высокий показатель теплоемкости, соответственно, характеризуется высоким коэффициентом поглощения ИК-спектра. По-другому, водная среда почти полностью поглощает инфракрасный свет. Поэтому спектры поглощения макромолекул, находящихся в водном растворе, полностью затушевываются растворителем. Для изучения макромолекул в ИК-спектрофотометре используют метод сухих пленок. Сухие пленки получают высушиванием концентрированных растворов на поверхности пластинок. Конечно, необходимо иметь в виду, что структура макромолекулы в сухой пленке существенно отличается от таковой в растворе. Вследствие этого ограничения, ИК-спектрофотометрия пока не нашла такого широкого применения в биологических исследованиях, как спектрофотометрия в видимом и ультрафиолетовом свете. При изображении спектров поглощения в ИК- свете не длина волны λ , а частота ν или волновое число $1/\nu$.

Применение инфракрасной спектрофотометрии:

Определение относительного содержания α -спирали, β -структур, беспорядочного клубка в белках по интенсивности амидных полос.

Установление количества водородных связей и функциональных групп, участвующих в образовании водородных связей в макромолекулах.

Изучение процессов денатурации и ренатурации молекул белков и НК по изменению числа водородных связей.

Определение относительного содержания А-Т (У) и Г-Ц в молекулах нуклеиновых кислот.

Изучение взаимодействия между небольшими молекулами, например, белка с лигандом, фермента с ингибитором и т.д.

Флуоресцентная спектроскопия

Флуоресцентные методы исследования являются более чувствительным, чем поглощающая спектроскопия. Термином флуоресценция обозначают испускание кванта видимого или УФ-света возбужденной молекулой, при переходе электрона с возбужденного синглетного уровня на основной уровень ($S^* \rightarrow S_0$). Возбужденное состояние молекулы при поглощении квантов электромагнитной волны, является неравновесным, и молекула быстро возвращается в основное состояние. Время нахождения электронов на возбужденных синглетных уровнях составляет $10^{-8} - 10^{-9}$ с. За это время электрон переходит на основной уровень, излучая энергию в виде тепла (инфракрасное излучение) или в виде квантов видимого или УФ-света (флуоресценция). При соударениях возбужденной молекулы с соседними молекулами возможна переориентация спина возбужденного электрона, и он переходит на триплетный T^* уровень. Триплетное состояние электронов является более стабильным, чем синглетное. Время нахождения электронов на триплетном уровне может составить несколько часов. Переход электрона с возбужденного триплетного уровня на основной ($T^* \rightarrow S_0$) также может сопровождаться испусканием квантов света. Это явление называется фосфоресценцией.

Флуоресценция и фосфоресценция зависят от типа молекул и от их окружения. Интенсивность флуоресценции изменяется в зависимости от длины волны возбуждающего света. Спектр флуоресценции – зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны испускаемого света. Спектр возбуждения – зависимость флуоресценции описывается квантовым выходом Q – отношением числа излученных квантов n_f к числу поглощенных квантов n_a :

$$Q = n_f/n_a$$

Интенсивность флуоресценции измеряют на приборах - спектрофлуориметрах. На рисунке 14 показана стандартная схема прибора для измерения флуоресценции. Во многом, устройство спектрофлуориметра сходно с устройством поглощающего спектрофотометра. Свет высокой интенсивности проходит через монохроматор, поглощается веществом в прозрачной кювете. Так как излучаемые флуоресцирующим веществом лучи испускаются во всех направлениях, то светочувствительный детектор установлен перпендикулярно направлению падающего луча. Это исключает измерение интенсивности

проходящего через кювету падающего света. При флуоресцентном анализе макромолекул используются два типа флуоресцирующих хромофоров: флуоресцирующие группировки в составе самих молекул и внесенные флуоресцирующие хромофоры, связанные с компонентами макромолекул (флуоресцентная метка).

Собственная флуоресценция белков. В составе белковых молекул содержатся три флуоресцирующих хромофора – остатки тирозина, триптофана и фенилаланина. Наиболее интенсивной флуоресценцией характеризуются триптофан и тирозин. Например, в водном растворе спектр возбуждения триптофана лежит в области длин волн от 200 до 300 нм, спектр флуоресценции – от 300 до 440 нм с $I_{\text{max}} = 353$ нм. Квантовый выход $Q = 0,13$ и время жизни $t = 3,1$ нс.

Интенсивность флуоресценции и другие параметры (I_{max} , Q , t) остатков аминокислот и сильно зависят от микроокружения (от типа растворителя, pH – раствора, присутствия других молекул или соседних групп в составе полипептида). Поэтому измерение флуоресценции дает ценную информацию об конформации белковых молекул. Для интерпретации данных собственной флуоресценции белков пользуются эмпирическими правилами и закономерностями, полученных при изучении модельных соединений с хорошо известной структурой и конформацией.

Флуоресцентные метки и зонды. Для исследования методом флуоресценции в изучаемую молекулу связывают с флуоресцирующим хромофором. Такой способ исследования получил название «метод флуоресцентных меток (зондов)». Для исследования белковых молекул в качестве таких меток используют 1-анилин-8-нафталинсульфонат-анион, 1-ДИМЕТИЛАМИНО-НАФТАЛИН-5-СУЛЬФОНАТ-АНИОН, РОДАМИН, флуоресцин. В качестве меток для нуклеиновых кислот используются акридиновый оранжевый, профлавин, акрифлавин, этидийбромид. Соединение, используемое в качестве флуоресцентной метки, должно удовлетворять следующим критериям:

- 1) хорошо должно связываться с определенным участком исследуемой молекулы;
- 2) его флуоресценция должна быть чувствительна к изменению условий окружения;
- 3) оно не должно оказывать влияние на свойства исследуемой макромолекулы.

Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм

В основе этих методов лежит одно и то же физическое явление: взаимодействие поляризованного света с оптически активными молекулами. Как известно, все биологические молекулы являются оптически активными, т.е. способными вращать плоскость поляризации при прохождении через них поляризованного света. Все молекулы, содержащие ассиметричный атом

углерода являются оптически активными. Как отмечалось выше, свет – электромагнитная волна, состоящая из осциллирующих электрического и магнитного полей. Вектор колебания электрического E и вектор магнитного H поля взаимно перпендикулярны. Плоскость поляризации определяется как плоскость колебания вектора E . Обычный, неполяризованный свет представляет собой набор волн со всеми возможными ориентациями векторов E и H . Плоскополяризованный свет можно получить, пропуская свет через поляризатор, например, через поляроид или призму Николя. Плоскополяризованный свет обладает такими же свойствами, как и обычный свет. При прохождении через вещество он преломляется (изменяется скорость распространения) и поглощается (уменьшается амплитуда вектора E). Преломление света характеризуется показателем преломления n , а поглощение молярным коэффициентом экстинкции ϵ . При взаимодействии поляризованного света с оптически активными молекулами, наряду с вращением плоскости поляризации, будет обнаруживаться и преломление, и поглощение света. Причем, коэффициенты преломления и поглощения, будут различаться в зависимости от направления вращения плоскости поляризации. Плоскополяризованный свет обладает соответствующими коэффициентами n и ϵ для правовращающей (nR и ϵR) и левовращающей (nL и ϵL) компонентов света. Любое оптически активное соединение будет характеризоваться соответствующими коэффициентами nL и ϵL , ϵL , ϵR при пропускании поляризованного света определенной длины волны. Величина вращения плоскости поляризации (угол поворота α_l) при этом будет зависеть от соотношения коэффициентов nL и ϵL , от концентрации молекул c , от длины оптического пути d (толщины раствора) и от длины волны l падающего света:

$$\alpha_l = 180^\circ d(nL - \epsilon L)/l$$

В практической работе используются показатель удельного вращения $[a]_l$

$$[a]_l = \alpha_l/dc$$

и показатель молярного вращения $[M]_l$

$$[M]_l = \alpha_l M/100 d c,$$

где α_l - угол поворота (град); d – длина оптического пути (дм); c – концентрация (г/мл); M – молекулярная масса (г/моль).

Зависимость оптического вращения, выраженного в виде α_l , $[M]_l$ или $[a]_l$, от длины волны поляризованного света называется спектром дисперсии оптического вращения (спектр ДОВ). Приборы, которые регистрируют спектры ДОВ, называются спектрополяриметрами.

Поглощение поляризованного света оптически активным веществом характеризуется молярным коэффициентом экстинкции ϵL , ϵR . В результате неодинакового поглощения право и левовращающей компоненты света линейно поляризованный свет превращается в эллиптически поляризованный свет. Это означает, что амплитуды колебания L , и R – волн будут изменяться в зависимости от угла поворота. В этом случае для характеристики

взаимодействия света с веществом вводится показатель эллиптичности q_l вещества

$$q_l = 180 d(eL - eR)/l$$

Молярная эллиптичность, $[q]$ выражается следующей формулой:

$$[q]l = Mq_l/10dc,$$

где q_l - измеренная эллиптичность в граду; M - молекулярная масса;

Часто молярную эллиптичность вычисляют по следующей формуле:

$$[q]l = 3300 (eL - eR)$$

Кривая описывающая зависимость эллиптичности или молярной эллиптичности от длины волны, называется спектром кругового дихроизма (спектр КД). Приборы, регистрирующие такой спектр, называются КД-дихрографами.

ДОВ-спектрометрию и КД-дихрографию используют для определения высших структур макромолекул. Наибольшее применение эти методы нашли при установлении вторичной структуры белков. Точность этого метода можно сравнить с рентгеноструктурным анализом, а трудоемкость значительно меньше (Таблица 1). Для получения спектров ДОВ и КД требуется несколько часов, а на проведение рентгеноструктурного анализа требуются недели. Для определения вторичной структуры белковой молекулы, измеренные спектры ДОВ и КД, сравнивают со спектрами стандартных (маркерных) полипептидов с известной структурой, заложенных в память компьютера. В частности, основными стандартами для белков являются три формы поли- L- лизина: α -спираль, β -форма и беспорядочный клубок.

Таблица 1 – Содержание спиральных структур (%) в молекулах белков по результатам рентгеноструктурного анализа и измерения КД-спектра.

Белок	КД-дихрография	Рентгеноструктурный анализ
Миоглобин	77	77
Лизоцим	29	29
РНК-аза	18	19
Папаин	21	21
Лактатдегидрогеназа	31	29
α -химотрипсин	8	9
Химотрисиноген	9	6

Кроме определения вторичной структуры белковых молекул, измерение ДОВ - и КД –спектров позволяют определить в динамике, изменения структуры белка при связывании с другими молекулами (фермент-субстрат, фермент-ингибитор, антиген-антитело и другие), денатурацию и ренатурацию молекул белков и НК, образование пространственной структуры макромолекул, т.е.

образование вторичной, третичной и четвертичной структур, переход одноцепочечных полинуклеотидов в двухцепочечные и наоборот, связывание т-РНК с аминокислотами.

1.3. Практическое использование ЯМР-спектроскопии и ЭПР-спектроскопии.

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) в настоящее время является широко используемым методом для изучения структуры биополимеров, о взаимодействиях между молекулами и о молекулярном движении. Рассмотрим теоретические основы этого метода на примере ЯМР для ядер атомов водорода ^1H .

Кроме заряда и массы, протон обладает механическим угловым моментом или спином I . Вращение заряженной частицы порождает магнитное поле; этот заряд можно представить, как точечный магнит, ориентированный вдоль оси вращения. Напряженность этого магнитного поля выражается как магнитный момент μ . Подобно стержневому магниту, имеющему северный и южный полюс, μ имеет направление. Протоны схематически можно представить в виде микроскопических магнитных стрелок. При отсутствии внешнего магнитного поля протоны имеют хаотическое распределение. При наложении внешнего магнитного поля с напряженностью H_0 возникает взаимодействие между магнитным моментом протона μ и H_0 . Энергия этого взаимодействия равна:

$$E = g \mu_N I H_0,$$

где g - ядерный g - фактор, μ_N - ядерный магнетон.

Для протона ядерное спиновое квантовое число I составляет $+1/2$, или $-1/2$. Во внешнем магнитном поле H_0 возможны две ориентации протонов: магнитные стрелки ориентируются по полю (параллельно линиям магнитного поля) с энергией $E_1 = -1/2 g \mu_N H_0$,

или против поля (антипараллельно линиям магнитного поля) с энергией $E_2 = +1/2 g \mu_N H_0$.

Разность энергий между уровнями равна

$$\Delta E = E_2 - E_1 = g \mu_N H_0.$$

Между энергетическими уровнями ядер E_2 и E_1 возможны переходы. При поглощении энергии электромагнитного излучения в области радиочастот ядрами происходит переход с одного уровня на другой. При наложении на систему ядер с различной ориентацией переменного магнитного поля (перпендикулярно постоянному магнитному полю H_0) происходит поглощение энергии волны определенной частоты ν_0 .

$\nu_0 = \gamma \hbar H_0 / h$, где h – постоянная Планка.

Поглощение энергии переменного магнитного поля ядрами атомов называют ядерным магнитным резонансом. Поглощенная энергия тратится на изменение ориентации ядер - изменение спина ядра. Для измерения ЯМР используются ЯМР-спектрометры (Рисунок 1). Этот прибор состоит из мощного электромагнита, который создает постоянное магнитное поле H_0 . Между полюсами магнита которого поле H_1 с частотой до 108 Гц, направлено перпендикулярно H_0 . Для достижения резонанса изменяют частоту переменного магнитного поля. При определенной частоте магнитные моменты ядер меняют ориентацию, происходит резонансное поглощение энергии переменного магнитного поля. Резкое изменение магнитного поля фиксируется детектором (катушка, в которой индуцируется электрический ток).

Любое ядро, например, протон, в магнитном поле может совершить только один переход. Спин протона может составлять или $+1/2$, или $-1/2$. Соответственно, спектр магнитного резонанса ядра должен состоять только из одной резонансной линии. Однако это не так, потому что ядра окружены электронами, и наложенное магнитное поле индуцирует также циркуляцию и этих электронов. Движущиеся электроны сами создают магнитное поле, которое также оказывает влияние на ориентацию ядра. Таким образом, наблюдаемая резонансная частота ядер определенных атомов зависит от их окружения, т.е. от структуры молекулы. Ценность ЯМР-спектроскопии обусловлена именно этим эффектом окружения, так как в молекуле резонансная частота определенного ядра одного и того же химического элемента, будет зависеть от химической группы, к которой принадлежит ядро. Например, резонансная частота протонов метильной группы будет отличаться от частоты протонов аминогруппы. Более того, частота протонов метильной группы толуола будет отличаться от частоты метильной группы уксусной кислоты. Такое смещение резонансной частоты, обусловленное химическим окружением, называется химическим сдвигом.

Для измерения химических сдвигов в кювету с исследуемым веществом вводят эталонное вещество – стандарт. В качестве стандарта часто используют тетраметилсилан $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Это вещество имеет 12 эквивалентных протонов, которые дают одну резонансную линию. Этой резонансной линии приписывают произвольную величину H_0 или ν_0 и выражают химический сдвиг как смещение от этой величины. Величину смещения от эталона выражают в виде безразмерных единиц - миллионных доля (м. д.).

$$\text{м. д.} = (\text{Нобр} - \text{Нэт}) 10^6 / H_0,$$

где Нобр и Нэт – резонансная напряженность магнитного поля для образца и стандарта, соответственно.

Преимущество такой безразмерной шкалы состоит в том, что химические сдвиги не зависят от действительной величины H_0 или от частоты переменного

радиомагнитного поля и поэтому можно сравнивать спектры, полученные на разных ЯМР-спектрометрах. На Рисунке 2 представлен протонный спектр аминокислоты лизина, на котором видно несколько резонансных линий протонов, и влияние химической группы на ЯМР-сигнал.

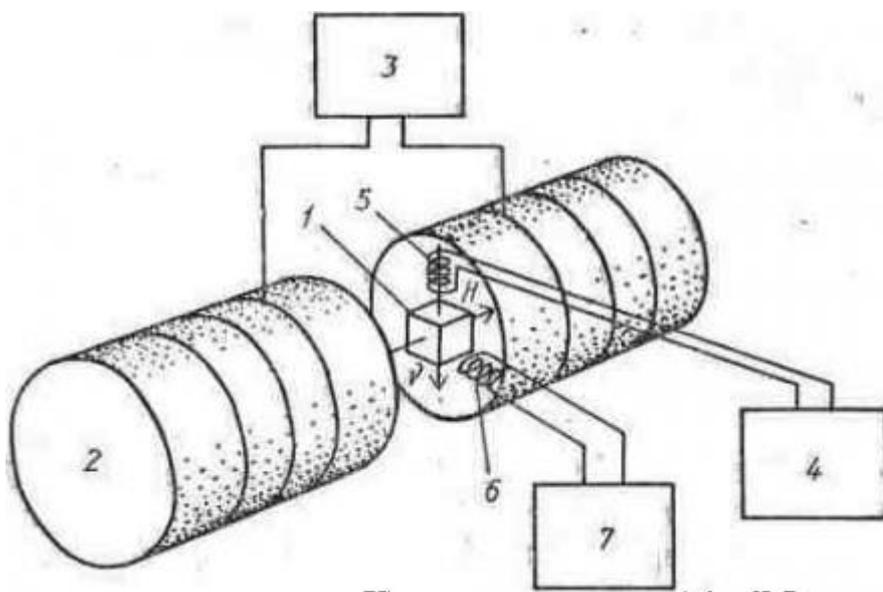


Рисунок 1 - Блок-схема ЯМР-спектрометра:

1 – образец; 2 – магнит постоянного поля; 3 – генератор переменного поля; 4 – генератор электромагнитного поля; 5 – катушка для передачи электромагнитного поля с частотой ν ; 6 – приемная катушка; 7 – система регистрации сигнала ЯМР.

ЯМР-томография. Вода в большом количестве входит в состав большинства биологических объектов. Основным ЯМР-сигналом биологических структур является сигнал протонного магнитного резонанса молекул воды. Интенсивность сигнала на данной частоте будет характеризовать относительное количество воды в ткани, которая находится в области определенного значения магнитного поля. Создавая в биологическом объекте градиент магнитного поля, можно получить спектр ЯМР протонов молекул воды. Профиль этого спектра будет определяться относительным содержанием молекул воды в той или иной части объекта. При помощи ЯМР-томографа биологический объект просвечивают во всех направлениях в магнитном поле. Затем с помощью компьютерного анализа воссоздают изображения по полученным проекциям. Таким образом, ЯМР-томография обеспечивает возможность изучения различных частей биологического объекта на основе различий амплитуды сигнала ЯМР в разных частях образца.

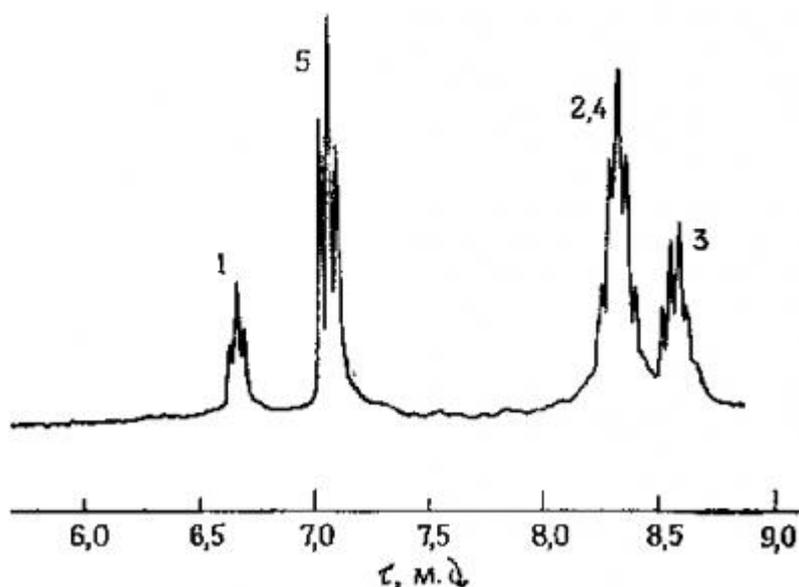
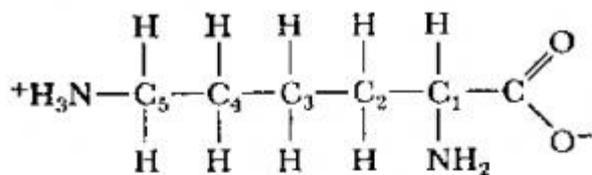


Рисунок 2 - ЯМР-спектр лизина, растворенного в тяжелой воде.

А) структурная формула лизина

Б) Спектр ЯМР молекулы лизина.

1,2,3,4,5 – номера атомов углерода, у которых находятся протоны, дающие данную группу линий

τ - химический сдвиг в м.д.

Таким методом определяются размер и положение областей в организме, различающихся по содержанию воды. Например, можно определить размер и положение внутренних органов, инородных тел, попавших в организм. Этот метод с успехом используются для определения размеров и локализации опухолей в организме человека. ЯМР-томография имеет большое преимущество перед рентгеновской томографией, так как радиочастотное электромагнитное облучение не вызывает повреждений биологического объекта.

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР).

Явление ЭПР состоит в резонансном поглощении энергии электромагнитного поля парамагнитным веществом, помещенным в постоянное магнитное поле. Однако не все электроны могут быть исследованы при помощи метода ЭПР. Большинство химических соединений состоит из атомов с заполненными электронными оболочками, в которых все электроны спарены

вследствие антипараллельной связи между ними. В соответствии с принципом Паули в результате попарного взаимодействия электронов их собственные спиновые магнитные моменты взаимно скомпенсированы, а суммарный магнитный момент равен нулю.

ЭПР-поглощение определяется магнитными свойствами вещества, т. е. магнитными свойствами электронов и ядер атомов.

Электрон обладает и собственным механическим вращением – спином и связанным с ним магнитным моментом. Условием возникновения ЭПР является наличие у частиц исследуемого образца некомпенсированных магнитных моментов, обусловленных спином неспаренных электронов. В системах с нечетным числом неспаренных электронов каждый электронный уровень вырожден по спину, по крайней мере дважды, т. е. уровни, характеризующиеся положительным и отрицательным значением магнитного квантового числа электрона m_s (например, $+1/2$ и $-1/2$), не отличаются по энергии.

В отсутствие внешнего магнитного поля все электроны парамагнитного вещества имеют произвольную ориентацию спина и обладают одинаковыми энергиями, т. е. наблюдается вырождение энергетического уровня. При помещении образца, обладающего парамагнетизмом, в постоянное магнитное поле вырождение снимается, т. е. появляются энергетические уровни, связанные с разрешенными ориентациями элементарных магнитных моментов электронов. Промежуточные ориентации спинов относительно магнитного поля запрещены условиями квантования.

Энергия частиц, спины которых ориентированы против поля на $1/2 g\beta H$, превышает значение в нулевом поле. Следовательно, разность энергий уровней равна $g\beta H$. Электроны в подсистемах E_1 и E_2 возникших во внешнем магнитном поле, почти равномерно распределяются по двум уровням энергии с незначительным преобладанием электронов со спином, ориентированным по полю.

Между двумя уровнями возможны энергетические переходы, в результате которых ориентация спинов будет изменяться на противоположную. Согласно принципам квантовой механики, переходы между энергетическими состояниями могут быть вызваны поглощением кванта $h\nu$. Если на спиновую систему, находящуюся в постоянном магнитном поле, воздействовать переменным сверхвысокочастотным электромагнитным полем с частотой ν и энергией квантов $h\nu$, то при условии резонанса

$$h\nu = DE = g\beta H$$

индуцируются переходы между указанными энергетическими уровнями, т.е. происходит обращение спинов. При переходе с нижнего E_1 уровня на верхний E_2 происходит поглощение энергии электромагнитного поля; одновременно с такой же вероятностью осуществляются переходы с уровня E_2 на уровень E_1 с испусканием энергии. Как правило, поглощение превышает

индуцированную эмиссию. Общее число неспаренных электронов в системе и разница в заселенности электронами двух энергетических уровней определяют интенсивность наблюдаемого сигнала ЭПР.

Измерение спектра ЭПР вследствие резонансных переходов электронов можно проводить двумя способами: 1) изменять напряженность магнитного поля H при фиксированном значении частоты ν ; 2) изменять ν при фиксированном значении H . На практике ЭПР-спектрометры работают на фиксированной частоте ν излучения при изменении H .

Как и ЯМР-спектрометр, ЭПР-спектрометр состоит из электромагнита, источника СВЧ-излучения и электронной системы регистрации сигнала. Но поскольку ядерный магнетон более чем на три порядка меньше магнетона Бора, то при данной напряженности магнитного поля H резонансная частота ν для неспаренного электрона обычно в 10^3 раз превышает частоту, на которой работают ЯМР-спектрометры. Если эксперименты по ЯМР проводятся на частотах в диапазоне мегагерц (106 Гц), то ЭПР-спектрометры работают в диапазоне гигагерц (109 Гц).

Основными параметрами сигнала ЭПР являются фактор спектроскопического расщепления (g -фактор), интенсивность (количество неспаренных электронов в образце), ширина и форма линии.

Фактор спектроскопического расщепления характеризует положение линии в спектре ЭПР, определяемое тем, насколько свойства неспаренных электронов, ответственные за поглощение энергии в данном веществе, близки к свойствам свободного электрона, магнетизм которого обусловлен только спином, а g -фактор равен 2,0023. Для большинства парамагнитных центров g -фактор отличается от значения 2,0023 в сторону, как уменьшения, так и увеличения.

Например, сигналы ЭПР, обусловленные низкоспиновым состоянием гемового железа цитохрома P-450 имеют $g_1 = 2,42$, $g_2 = 2,25$ и $g_3 = 1,91$. Восстановление этой молекулы переводит атом железа высокоспиновую форму со значениями $g_1 = 6,1$ и $g_2 = 2,0$ в спектре ЭПР.

Для парамагнитных центров, содержащих магнитные ядра, в спектре ЭПР возможно наблюдение сверхтонкой структуры (СТС), которая возникает в результате взаимодействия неспаренных электронов с магнитными моментами ядер. Аналогично электронным спинам, ядерные магнитные моменты, ориентируются в магнитном поле дискретно (либо вдоль внешнего магнитного поля, либо против него). Ядра многих атомов обладают спином и, следовательно, собственным магнитным моментом, который по абсолютной величине на три порядка меньше магнитного момента электрона. Количество компонентов сверхтонкой структуры определяется значениями ядерного спина данного атома по формуле $2I + 1$, где I – значение ядерного спина атома. Следовательно, взаимодействие электрона с ядром приводит к расщеплению каждого электронного уровня энергии на $2I + 1$ уровней. Вследствие этого

резонансное поглощение также расщепляется на $2I + 1$ равноудаленных линий одинаковой интенсивности.

С помощью метода ЭПР показано, что биологические системы животного и растительного происхождения содержат свободные радикалы, которые представляют собой молекулу или ее компоненты, имеющие неспаренный электрон. Свободные радикалы обладают парамагнитными свойствами благодаря и ее компенсированным магнитным моментам неспаренных электронов.

Метод ЭПР нашел эффективное применение для изучения молекулярных переносчиков электронотранспортной цепи мембран митохондрий, включающих НАДН, флавины, кофермент Q10, железосерные центры, цитохромы *b*, *c*₁, *c*, а также цитохром-*c*-оксидазу. В митохондриях различных органов при низких температурах (-200 С) регистрируется сигнал ЭПР с *g*-фактором 1,94, который обусловлен комплексами негемового железа в восстановленной форме.

ЭПР-спектроскопия получила дальнейшее свое развитие вследствие применения спиновых меток, синтезированных соединений, содержащих парамагнитный центр. При исследовании биологических молекул в качестве спиновых меток широко используют нитроксильные радикалы, которые ковалентно связываются молекулами (N¹-O, которая содержит неспаренные электроны). Если парамагнитный радикал связывается с биологической молекулой электростатическими силами или гидрофобными взаимодействиями, то такой радикал называется спиновым зондом.

Интерпретация интенсивности, ширины и формы линий спектра ЭПР спиновой метки, введенной в биологическую структуру, дает информацию о физических и физико-химических параметрах микроокружения нитроксильного радикала. Определение спектра ЯМР позволяет судить о фазовых переходах в липидном бислое мембраны и других средах. Так, параметр упорядоченности для липидов в жидком состоянии в несколько раз выше, чем в твердом состоянии. Снижение вязкости мембран приводит к уменьшению значения этого параметра.

Благодаря применению спиновых меток и зондов получены новые данные о строении и функционировании субклеточных структур, о липидах и белках, о липид-белковых взаимодействиях в мембранах.

Примеры использования ЯМР и ЭПР – спектроскопии:

1. Состояние молекул белков и липидов при фазовых переходах липидов мембран, белок-липидные взаимодействия;
2. исследование свойств активных центров ферментов, роли кофактора в ферментно-субстратном связывании;
3. изменение структуры т-РНК при спаривании оснований;
4. Измерение расстояния между атомными группировками, содержащие различные свободные радикалы.

1.4. Практическое применение методов протеомного анализа. Электрофорез.

Протеомика (англ. proteomics) — область молекулярной биологии, посвящённая идентификации и количественному анализу белков (иными словами, высокопроизводительному исследованию белков). Термин «протеомика» был предложен в 1997 году. Совокупность всех белков клетки называют протеомом.

Объектом изучения протеомики являются белки, которые экспрессируются в данной клетке, ткани или организме в данный момент времени (то есть протеом). Хотя первые методы протеомики, например, секвенирование белков по Эдману, появились задолго до геномных технологий, действительно высокопроизводительное изучение белков стало возможным только в постгеномную эпоху, то есть при наличии известных нуклеотидных последовательностей геномов разных организмов.

Традиционный подход к изучению белков подразумевает их выделение из тканей и клеток, последующую очистку, в результате чего становится возможным анализировать структуру и функции очищенного белка. Протеомика использует другой подход: всё белковое содержимое клетки можно увидеть и проанализировать в одну стадию. Это стало возможным благодаря появлению и развитию таких методов и технологий, как масс-спектрометрия и двумерный электрофорез. Однако методы протеомики не исчерпываются этими двумя примерами. Ниже рассмотрены используемые на данный момент методы исследования белков, в том числе методы количественного анализа и секвенирования аминокислотной последовательности белка, которые на современном этапе используются редко.

Количественный анализ, не требующий информации о структурах белков.

Количественный анализ белков с ферментативной активностью можно опосредованно проводить через определение активности этих белков. Ещё в начале XX века подобный анализ можно было осуществить с помощью методов спектрофотометрии. При этом количество катализатора оценивается в условных единицах активности. Условные единицы активности до сих пор используют для описания концентрации в крови таких биомаркеров, как аланинаминотрансфераза и аспартатаминотрансфераза. В 1975 году был разработан способ получения моноклональных антител, и они быстро нашли применение в исследовании белков. Например, если известен антиген данного антитела, то с помощью этого антитела можно идентифицировать исследуемый антиген в экспериментальном образце. В медицине в качестве биомаркеров и в XXI веке широко используются антитела, антигены которых неизвестны, но которые связывают у больных людей гораздо больше антигена, чем у здоровых. Например, гликопротеин СА-125 использовали как биомаркер рака яичников с

1981 года, когда были получены антитела к нему. Значительно позднее идентифицировали сам белок — муцин 16.

Секвенирование последовательности белка.

Метод Эдмана.

В 1953 году Фредерик Сенгер определил аминокислотную последовательность гормона инсулина. Для мечения и идентификации N-концевого остатка Сенгер предложил использовать 1-фтор-2,4-динитробензол. После связывания с этим реагентом N-концевого остатка белка полипептидную цепь гидролизуют соляной кислотой до отдельных аминокислот и выявляют меченный остаток. Если белок состоит из нескольких полипептидных цепей, то пометятся оба N-концевых остатка, то есть будет установлено число отдельных полипептидных цепей в белке. Для секвенирования всей белковой последовательности чаще применяют метод секвенирования по Эдману.

В 1950-х годах шведский химик Пер Эдман изобрёл метод определения аминокислотной последовательности белков (секвенирование). Первый этап секвенирования по Эдману — обработка исследуемого пептида изотиоцианатом фенила, который взаимодействует с аминогруппой, давая фенилтиокарбомоильный радикал. При умеренном закислении раствора он отщепляется, захватывая вместе с собой N-концевую аминокислоту. В результате в раствор выходит тиазолинон с радикалом, специфичным для данной аминокислоты. Это производное анализируют хроматографически, определяя, какая аминокислота была на N-конце, и цикл повторяется. Если исследуемый белок закреплён на твёрдой подложке, то после каждой обработки изотиоцианатом фенила его можно промывать, удаляя тиазолинон с N-концевой кислотой, и начинать новый цикл. Метод Эдмана позволяет с высокой точностью определять последовательность длиной до 30 аминокислотных остатков. Высокая чувствительность метода также позволяет секвенировать менее 0,1 нмоль пептида с 99% точностью. Длина полипептидной цепи, которую можно секвенировать методом Эдмана, зависит от эффективности отдельных стадий, которая, в свою очередь, определяется аминокислотным составом полипептида.

В 1960-х годах был создан автоматический секвенатор, реализующий метод Эдмана. Первичную структуру инсулина, на определение которой у Сенгера ушло более 10 лет, в настоящее время можно получить за пару дней прямым секвенированием на белковом секвенаторе. Метод Эдмана сейчас изредка используют при исследовании организмов, геномные последовательности которых неизвестны. Традиционное секвенирование белков также применяют в тех случаях, когда многие их особенности

(например, посттрансляционные модификации) нельзя узнать только лишь из последовательности гена.

Большинство белков перед секвенированием необходимо приготовить к нему особым образом. Сначала в белке разрушают дисульфидные связи, если они есть, при помощи окисления надмуравьиной кислотой или восстановления дитиотреитолом. Далее белковую цепь дробят на фрагменты протеазами, поскольку секвенирование длинных белков имеет невысокую точность. Обычно для гидролиза используют трипсин, который действует только на те пептидные связи, карбонильная группа которых принадлежит остатку лизина или аргинина. Поэтому, если при полном гидролизе определить число лизиновых и аргининовых остатков в белке, можно предсказать, на сколько фрагментов распадется белок после обработки трипсином. Полученные фрагменты далее чистят с помощью электрофореза или хроматографии и секвенируют по Эдману. Чтобы восстановить последовательность белка по фрагментам, его разрезают на куски ферментом, который распознаёт остатки, отличные от тех, которые распознаёт трипсин. На основании перекрытий двух полученных наборов фрагментов восстанавливают полную аминокислотную последовательность белка.

Для определения положения дисульфидных связей белок снова расщепляют трипсином, но не разрушая предварительно дисульфидные связи. Образующиеся фрагменты разделяют электрофорезом и сравнивают с набором фрагментов, полученных при первом расщеплении трипсином. Если между двумя фрагментами есть дисульфидная связь, то при разделении первого набора фрагментов они будут выглядеть на геле как две полосы, а при электрофорезе второго образуют единую полосу.

Двумерный гель-электрофорез.

В 1970—1980-х годах достигли расцвета методы выделения и очистки белков. Эти методы сочетали принципы хроматографии, электрофореза и центрифугирования; многие из них давно вышли из употребления, но некоторые используются и в XXI веке.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

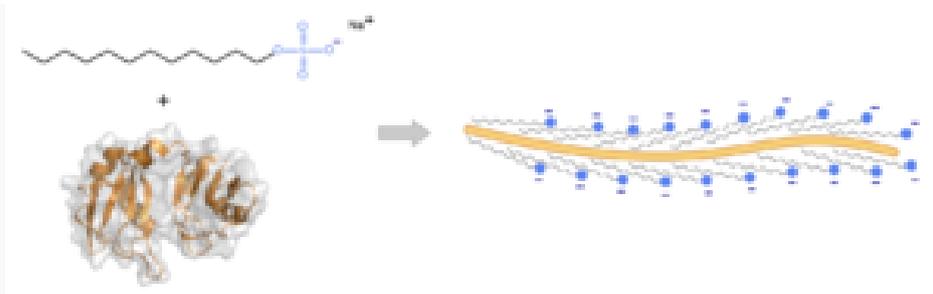


Рисунок 3. Денатурация белка под действием SDS

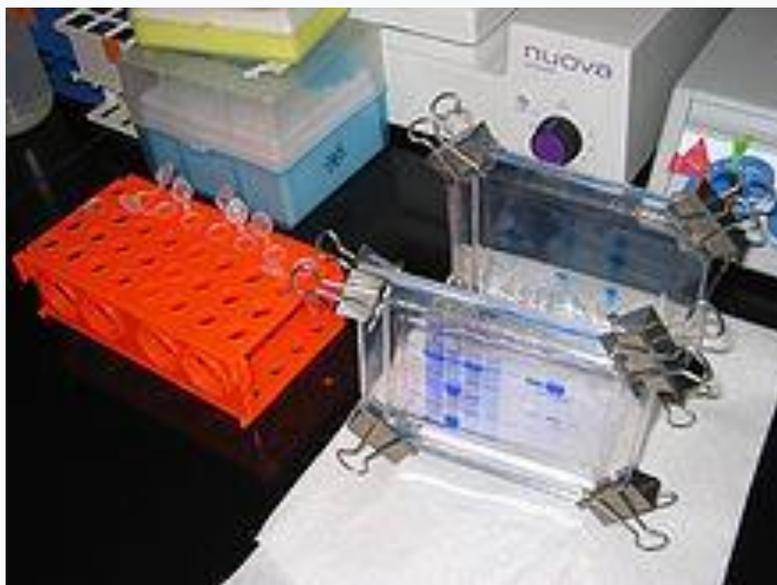


Рисунок 4 - Два геля белкового электрофореза после окрашивания кумасси.

В 1970 году швейцарский учёный Ульрих Лэммли предложил метод разделения белков при помощи электрофореза в денатурирующих условиях. Сначала белки подвергали жёсткой денатурации под действием додецилсульфата натрия (англ. *sodium dodecyl sulphate*, *SDS*), который в виде слоя покрывал каждую белковую молекулу. Чем больше был белок, тем больше SDS связывалось с ним и тем больший отрицательный заряд приобретал их комплекс (Рисунок 3, 4). Поэтому при нанесении образцов на полиакриламидный гель они начинали двигаться под действием электрического поля; при этом скорость движения белковых молекул зависит от их массы (более лёгкие белки перемещаются по гелю быстрее). Метод хорошо подходит для разделения белков с массой от 5 до 250 кДа.

Метод Лэммли получил дальнейшее развитие. В 1975 году Патрик О'Фарелл и Йоахим Клозе независимо друг от друга предложили принцип так называемого двумерного электрофореза (Рисунок 5): перед разделением по массе с помощью SDS белки предварительно разделяются согласно их изоэлектрической точке. Сначала белки вносят в стеклянную трубку, заполненную особыми полимерами, которые создают в ней неподвижный

градиент рН. Белки распределяются по трубке, занимая места, рН которых равен их изоэлектрической точке.

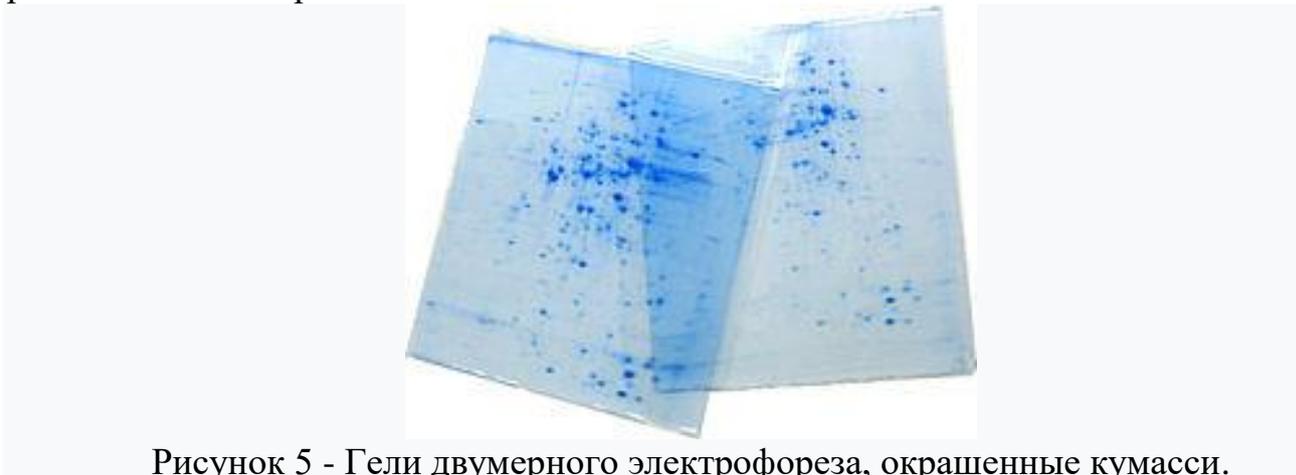


Рисунок 5 - Гели двумерного электрофореза, окрашенные кумасси.

Далее содержимое трубки выдавливают и приплавляют к гелю для обычного электрофореза по Лэммли. Таким образом, сначала белки делятся по изоэлектрической точке, а потом по массе. В результате двумерного электрофореза каждому белку соответствует не полоса, как при обычном электрофорезе, а сфокусированное округлое пятно, размер и интенсивность окрашивания которого соответствуют концентрации белка. С помощью двумерного электрофореза можно разделять не только различные белки, но и изоформы одного и того же белка, а также формы белка с разными посттрансляционными модификациями. Были предложены различные усовершенствования методики двумерного электрофореза, некоторые его этапы, а также обработка отсканированных гелей, были автоматизированы. По сути, двумерный электрофорез — единственный способ наглядного представления протеома.

Вестерн-блоттинг.

В ряде случаев необходимо установить, с какими клеточными белками взаимодействуют выделенные антитела. Нередко стоит и обратная задача: определить выделенный белок можно с помощью антител, специфически с ним связывающихся. Для этого существует метод вестерн-блоттинга (Рисунок 6), или иммуноблоттинга. При его применении вначале белки из исследуемого лизата разделяют при помощи гель-электрофореза, а из геля переносят на пористую мембрану. Далее мембрану последовательно обрабатывают антителами, специфичными к искомому белку, и радиоактивно-мечеными антителами, связывающимися с первыми антителами.

Иногда вместо вторых антител производят ферментативную реакцию с первыми антителами.



Рисунок 6 - Схема вестерн-блоттинга. Белки разделяют при помощи электрофореза (1) и переносят на мембрану (2). Далее мембрану обрабатывают первыми (3) и вторыми (4) антителами, после чего выявляют полосы, связанные с антителами.

В результате молекулы искомого белка, распознанные антителами, выявляются как полосы на автордиограмме или пятна на мембране, по которым можно идентифицировать белок.

Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия включает ряд методов, которые направлены на определение молекулярной массы исследуемых соединений (Рисунок 7). Она нашла широкое применение и в биологии, в особенности в протеомике.

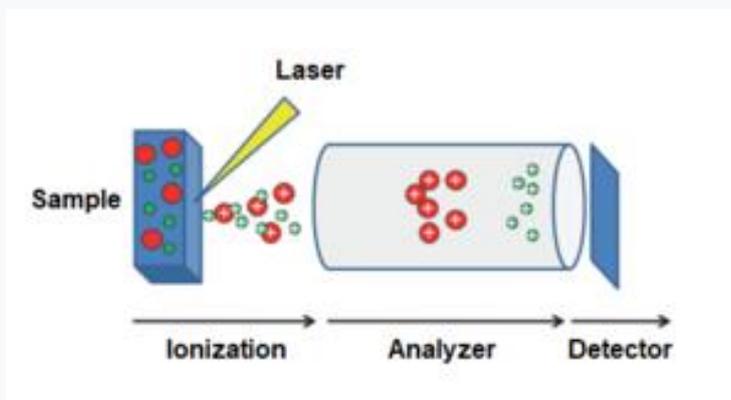


Рисунок 7 - Схема масс-спектрометра, использующего ионизацию методом MALDI. Матрица, содержащая исследуемые молекулы, облучается лазером и ионизируется, ионизируя исследуемые пептиды, которые впоследствии и детектируются

При применении масс-спектрометрии сначала белки, находящиеся в образце, ионизируют, потом в условиях вакуума ионы сортируются и детектируются, давая на выходе спектр, который дальше анализируется специальными вычислительными методами. В конечном итоге для каждого иона определяется значение отношения массы к заряду. Если заряд иона равен

единице, то отношение численно равно его молекулярной массе. Поначалу использование масс-спектрометрии в биологии было ограничено из-за того, что ионизация была очень жёсткой и приводила к разрушению молекул. В 1980-х годах был разработан метод ионизации молекул лазером при их сокристаллизации со светочувствительным органическим веществом (его называют матрицей). Матрица окружает молекулы исследуемого вещества и под действием лазера ионизирует соседние молекулы. В некоторых условиях ионизацию можно провести без разрушения исследуемых молекул. Этот метод получил название опосредованная матрицей лазерная десорбция-ионизация (англ. *matrix-assisted laser desorption ionisation, MALDI*). Новый метод ионизации совместили с обычным масс-спектрометрическим детектором (времяпролётным, англ. *time-of-flight, TOF*). В этом детекторе ионы движутся в вакуумной трубке и достигают чувствительной пластины (фотоэлектронного умножителя), которая и является детектором. Время, за которое ион преодолевает длину трубки, обратно пропорционально его массе. В 1990-е и в начале 2000-х годов метод MALDI-TOF очень активно использовался для исследований белков.

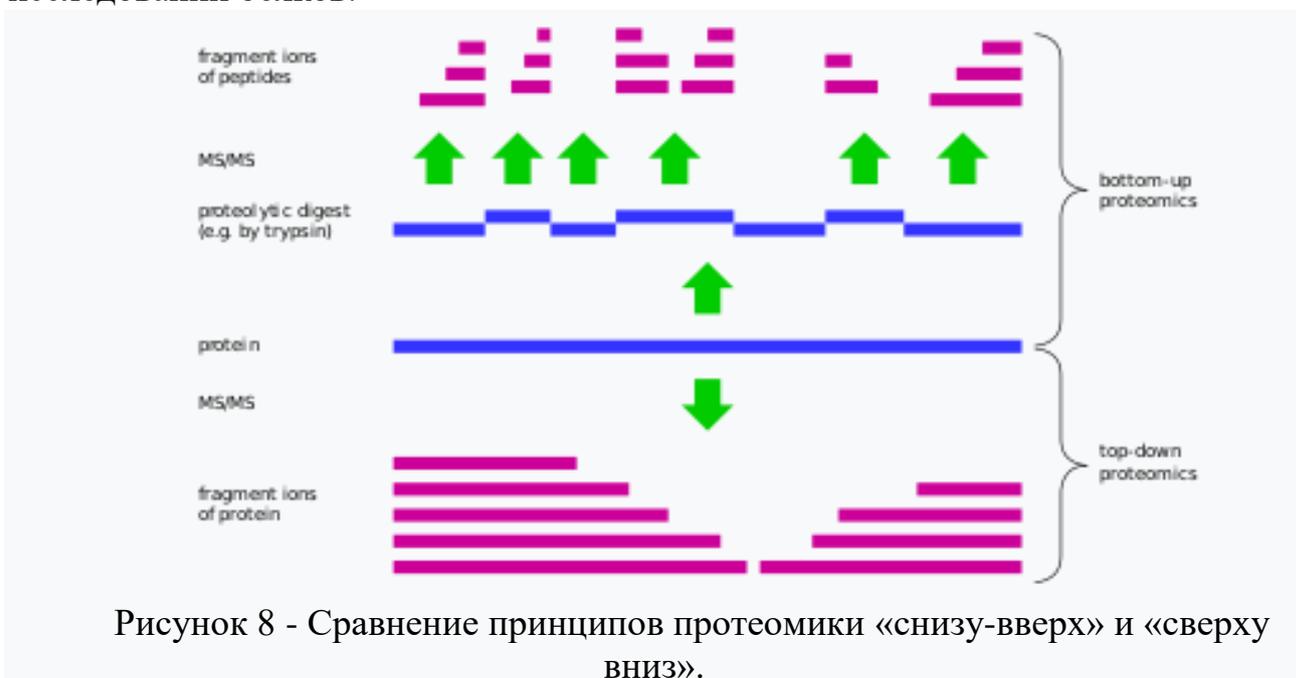


Рисунок 8 - Сравнение принципов протеомики «снизу-вверх» и «сверху вниз».

Из-за особенностей изотопного разделения пики в спектрах больших белков чрезвычайно сложно анализировать. По этой причине перед исследованием их с помощью фермента трипсина разрушают на пептиды массой 500—2500 Да, и затем по данным для пептидов восстанавливают информацию об исходном белке подобно тому, как при секвенировании нуклеиновых кислот нового поколения исходные последовательности собираются из коротких прочтений. Этот подход называется «протеомикой снизу вверх» (англ. *bottom-up*) (Рисунок 8). Процесс сборки небезошибочен и приводит к большим потерям информации, поэтому в некоторых случаях

исследуются целые белки без расщепления с помощью мощных детекторов сверхвысокого разрешения («протеомика сверху вниз», англ. *top-down*).

Набор молекулярных масс пептидов, которые были получены при обработке белка трипсином, уникален для каждого белка. Это связано в основном с высокой специфичностью трипсина, который вносит разрез только по остаткам лизина и аргинина. Сравнивая полученную картину молекулярных масс пептидов для исследуемого белка с пептидными картами белков из баз данных, можно установить, какой именно белок исследовался. Этот подход получил название пептидной дактилоскопии. Поскольку полного соответствия экспериментального распределения масс пептидов и эталонных пептидных карт достичь невозможно, была введена количественная оценка (англ. *score*) вероятности того, что экспериментальная пептидная карта соответствует данной теоретической. Для пептидной дактилоскопии были разработаны специальные программы, например, MOWSE.

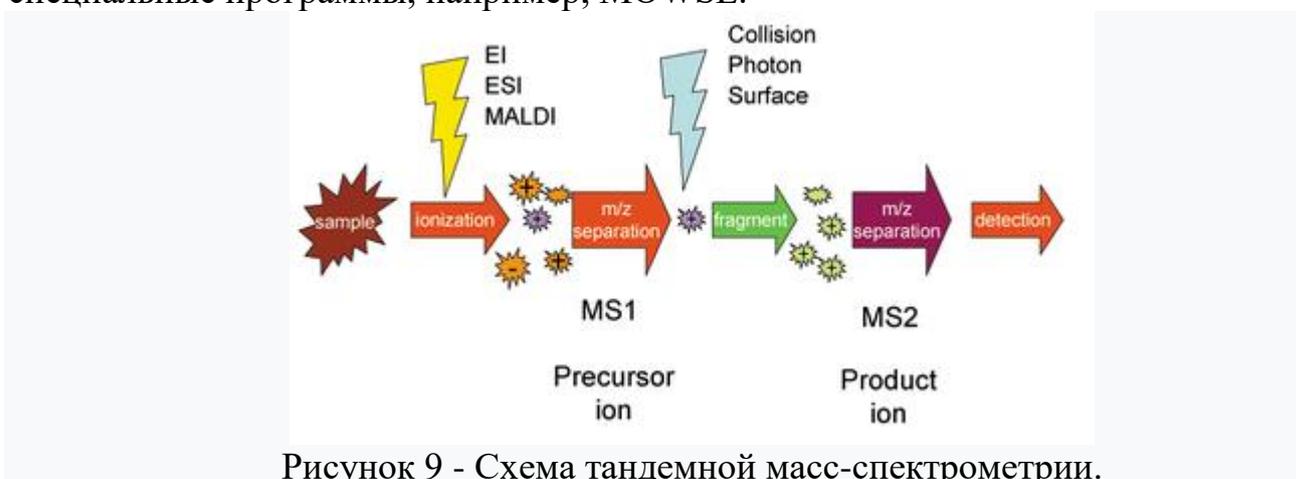


Рисунок 9 - Схема тандемной масс-спектрометрии.

Вместо фрагментации трипсином перед установкой образцов в масс-спектрометр фрагментацию белков на фрагменты можно осуществлять в самом масс-спектрометре, например, при помощи столкновения с молекулами инертных газов. При этом каждый пептид характеризуется массой иона-предшественника и набором масс ионов-фрагментов. Массы фрагментов можно измерить и по ним восстановить информацию об исходном белке, так как молекулярные массы фрагментов можно найти исходя из последовательности пептида. Такой подход получил название тандемной масс-спектрометрии (MS-MS). Как и при пептидной дактилоскопии, в тандемной масс-спектрометрии имеет место вероятностная оценка того, что пептидная карта исследуемого белка соответствует одной из теоретических. В 2007 году для анализа данных тандемной масс-спектрометрии (Рисунок 9) был предложен подход *target-decoy*. Суть этого подхода заключается в том, что при анализе данных к целевым теоретическим пептидам (англ. *Target* — цель) стали добавлять равное количество бессмысленных, фальшивых (англ. *Decoy* — ложная цель) пептидов. Этот подход позволяет оценить качество анализа. Если анализ в качестве лучших соответствий выдаёт соответствие экспериментального белка

с заведомо фальшивым, то он даёт ложноположительный результат, а подход *target-decoy* позволяет оценить долю ложноположительных результатов.

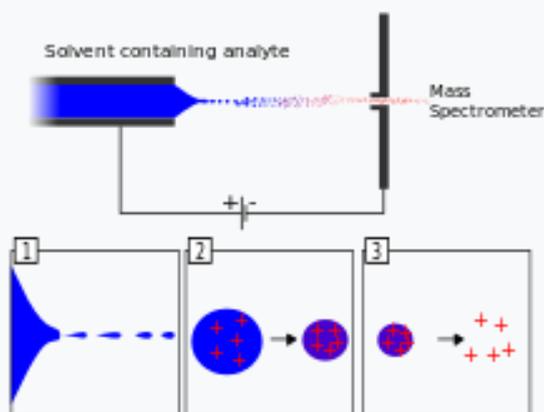


Рисунок 10 - Схема ионизации электроспреем. (1) Под действием высокого напряжения из капилляра выходит струя капле жидкости (аэрозоль). (2) Растворитель в аэрозоле испаряется, заряд начинает переходить на исследуемые молекулы. (3) От капли остаётся скопление заряженных ионов.

В качестве альтернативы MALDI ионизацию пептидов перед масс-спектрометрией можно осуществлять с помощью метода ионизации электрораспылением (Рисунок 10), или ионизации электроспреем (англ. *electrospray ionisation, ESI*). Жидкость, содержащая исследуемые белки, помещается в конический капилляр, а когда она выходит из капилляра, к ней прилагается сильное напряжение. В результате жидкость превращается в аэрозоль, и при испарении частиц аэрозоля в потоке инертного газа заряд может переходить на растворённые в аэрозоле биомолекулы, в том числе белки. При таком способе ионизации биомолекулы не разрушаются. Ионизацию электроспреем можно легко совместить с высокоэффективной жидкостной хроматографией: поток хроматографической фазы с колонки можно направить прямо в капилляр для электрораспыления. Таким образом, масс-спектрометр будет определять массы разделяемых в аналитической колонке молекул. Этот метод обозначают аббревиатурой LC-MS (от англ. *liquid chromatography – mass spectrometry*). Идентификация белков в сложном растворе при помощи комбинации масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии получила название протеомики-дробовика, или скорострельной протеомики (англ. *shotgun proteomics*).

Методы масс-спектрометрии могут быть использованы для направленного обнаружения искомым белков, то есть масс-спектрометр можно настроить таким образом, чтобы он видел только нужный пептид. Для этой цели используют прибор с детектором типа тройного квадруполя, то есть три одинаковых масс-спектрометра, последовательно передающие друг другу ионы. Первый масс-спектрометр отфильтровывает интересующий пептид, во втором он фрагментируется, а третий регистрирует от 3 до 5 заранее выбранных фрагментов. Количественный анализ производится на основе

интенсивности фрагментов. Этот метод известен как мониторинг множественных реакций (англ. *multiple reaction monitoring, MRM*), или мониторинг выбранных реакций (англ. *selected reaction monitoring, SRM*).

Белок-белковые взаимодействия.

Один из наиболее популярных методов изучения белок-белковых взаимодействий — использование дрожжевой двугибридной системы. Для этой цели получают два штамма гаплоидных дрожжей, один из которых исследуемый белок (приманка), а второй — белок, который необходимо проверить на предмет взаимодействия с первым (добыча). Далее гаплоидные клетки сливают с образованием диплоидных клеток дрожжей, экспрессирующих оба белка. Если белки взаимодействуют, то они оба составят транскрипционный фактор, запускающий экспрессию репортёрного гена. Если же взаимодействия между белками нет, то и экспрессия репортёрного гена не запускается. С помощью такого подхода у дрожжей *S. cerevisiae* при скрининге 6000 клонов добычи против 6000 клонов приманки удалось идентифицировать 691 белок-белковое взаимодействие, из которых только 88 были известны ранее. В XXI веке для исследования белок-белковых взаимодействий применяются и другие методы, такие как плазмонный резонанс.

На основании данных о белок-белковых взаимодействиях в ряде случаев можно судить о функциях белка. Например, если известно, что белок взаимодействует с несколькими белками одного метаболического пути, вполне вероятно, что он тоже в нём задействован. Карты белковых взаимодействий называют интерактом. Существуют базы данных, хранящие информацию о взаимодействиях белков.

Данные о белок-белковых взаимодействиях чрезвычайно важны для биологических сетей и системной биологии: они, например, используются при реконструкции сигнальных каскадов.

Белковые микрочипы.

Белковые микрочипы разрабатываются для идентификации определённых белков в образце. По аналогии с ДНК-микрочипами, на твёрдую подложку наносятся очень маленькие капли, содержащие антитела. В каждой капле находятся меченые антитела к одному определённому белку, который добавляется на чип в виде флуоресцентно-меченой пробы. После промывки флуоресценция детектируется только в тех каплях, в которых антитела связали исследуемый белок. Вместо антител можно использовать другие молекулы, специфически взаимодействующие с конкретными белками, например, олигонуклеотиды. Белковые микрочипы также можно использовать для обнаружения белок-белковых взаимодействий и определения функций белков. В 2000-е годы белковые микрочипы автоматизированы. Они обладают высокой чувствительностью и требуют совсем небольшого количества исследуемого белка, благодаря чему отличаются экономичностью.

С помощью масс-спектрометрии и чипов можно получить информацию о фрагментах белка, но не о белке целиком. В связи с этим созданы программы, которые из фрагментарных данных масс-спектрометрии и чипов выдают данные о почти полностью собранных из этих фрагментов белков. Эти программы основаны на построении выравниваний фрагментов с известными белками из баз данных UniProt и PROSITE.

В большинстве программ, анализирующих белки, не учитываются их посттрансляционные модификации. Существующие инструменты, определяющие посттрансляционные модификации, имеют лишь предсказательный характер.

Вычислительные методы биоинформатики активно используются для изучения белков-биомаркеров. Так, с помощью компьютерных моделей удалось показать интенсивный обмен белками между организмом матери и плодом при беременности, причём для анализа требовался лишь неинвазивный забор крови у матери.

Развивается такое направление, как протеогеномика, которая использует методы протеомики для подтверждения данных, полученных из геномных последовательностей. Существует также структурная протеомика, которая занимается широкомасштабным исследованием структур белков на основе данных рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии.

Примеры использования протеомно-метаболического анализа в медицинских исследованиях.

Pang J et al. (2010) установили, что метастазирование рака предстательной железы сопряжено с изменениями тканевой экспрессии не менее 58 белков, 6 из которых (e-FABP-5, MCCC-2, PPA-2, эзрин, SM-22 и SLP-2) функционально релевантны метастазам в лимфатические узлы и могут рассматриваться на роль биомаркеров этого процесса. Более того, лимфогенное метастазирование сопровождается повышением сывороточных титров соединения e-FABP-5, что так же можно использовать в диагностических целях.

Kistler AD et al. (2009) исследовали протеомные профайлы, которые специфичны для поликистоза почек, наследуемого по аутосомно-доминантному типу. Релевантными оказались 197 белков, в большинстве своем фрагменты молекул коллагенов и уромодулинов. 38 пептидов отличились высокой чувствительностью и специфичностью при сравнении с группами здоровых субъектов, пациентов с другими урологическими заболеваниями и раком почек/мочевого пузыря.

Открытие новой нозологической единицы. Склероз простаты, ретроперитонеальный фиброз в некоторых случаях могут быть маской т.н. «аутоиммунного панкреатита» или IgG4-синдрома, при котором диссеминированные поражения различных органов и систем организма происходят попутно с хроническим воспалением поджелудочной железы, дефектами гепато-биллиарного дерева на фоне стойкой гипергамма-

глобулинэмии и повышенных титров аутоантител к АСА-II (по Sánchez-Castañón M et al., 2010).

1.5. Практическое применение хроматографических методов.

Хроматографические методы анализа основаны на циклических актах сорбции-десорбции, происходящих между подвижной фазой (элюентом) с растворенной пробой и неподвижным сорбентом. Компоненты сложных смесей имеют различную сорбируемость, и проходя вдоль неподвижной фазы, поглощаются с неодинаковой скоростью и в разном количестве. Последующее изучение результатов и их сравнение с эталоном позволяет установить точный состав реактива.

В традиционном методе в качестве неподвижной фазы используется материал с развитой поверхностью, а элюентом выступает поток инертного газа или жидкости. Фильтрация элюента через слой сорбента запускает многократное повторение сорбции и десорбции, что и отличает хроматографические методы анализа от других аналитических методик и обуславливает их эффективность.

Качественный и количественный анализ.

Хроматографические методы анализа устанавливают качественный и количественный состав вещества. При качественных испытаниях пробу идентифицируют по ее хроматограмме, сравнивая полученные параметры с эталонными значениями, хранящимися в библиотеке данных.

Количественный метод анализа строится на измерении пиков, формирующихся в зависимости от концентрации примесей. Лаборант изучает хроматограмму одним из следующих методов:

- Метод абсолютной градуировки. Зависимость параметров пика от концентрации разных веществ определяется экспериментально. Затем составляются графики и таблицы, с которыми в последующем и сравнивается хроматограмма. Благодаря простоте и высокой точности, метод является основным для выявления микропримесей.

- Метод внутренней нормализации. Сумма выбранных пиковых параметров (например, их высота или площадь) принимается за 100%. Далее рассчитывается отношение высоты отдельного изучаемого пика к суммарному значению, благодаря чему определяется массовая доля конкретного компонента в пробе.

- Метод внутреннего стандарта. В смесь вводится стандартное вещество, для которого заранее известен калибровочный график. Затем пики изучаемых компонентов сравниваются с пиками «стандарта». Метод применяют в случае исследования составов с переменным, но известным количеством анализируемых компонентов.

Методы постоянно дорабатываются и совершенствуются, что позволяет получать более точные данные при анализе сложных смесей и нивелировать шумы на хроматограммах.

Классификация хроматографических методов анализа.

Хроматографические методы разделяются на несколько групп в зависимости от сравниваемых параметров. По агрегатному состоянию фаз хроматографические методы анализа делятся на:

- Газожидкостные. Подвижной фазой служит поток инертного газа, который проходит через жидкий сорбент.
- Газоадсорбционные. Проба в газообразном состоянии пропускается через твердое вещество, на поверхности которого осуществляется адсорбция.
- Жидкостно-жидкостные. В качестве элюента и неподвижной фазы используются жидкие среды.
- Жидкостно-адсорбционные. Реагент подается вместе с растворителем и проходит через твердый пористый материал.
- Жидкостно-гелевые. В этом методе неподвижная фаза представлена гелеобразным веществом.

Вторая классификация касается конструкции хроматографического оборудования. В большинстве методов применяется колоночный хроматограф: адсорбция осуществляется в колонках, заполненных неподвижной фазой. Но иногда используется плоскостная хроматография, в которой используется тонкий срез сорбента или специальная бумага. Также в последнее время получили распространение капиллярный хроматографический метод, при котором разделение происходит в пленке жидкости, и хроматография в полях, требующая для проведения анализа создания дополнительных магнитных, центробежных или иных сил.

Хроматографические методы анализа отличаются особенностями взаимодействия элюента и адсорбента. По механизмам разделения хроматография делится на:

- Адсорбционную — основывается на разнице в адсорбируемости компонентов пробы;
- Распределительную — протекает за счет различной растворимости веществ в фазах;
- Ионообменную — осуществляется благодаря достижению констант ионообменного равновесия;
- Проникающую — строится на разнице в формах и размерах молекул;
- Осадочную — происходит благодаря осаждению нерастворимых соединений;
- адсорбционно-комплексообразовательную — выполняется за счет образования на поверхности неподвижной фазы координационных соединений разной прочности.

Следующая классификация разделяет хроматографические методы анализа на три группы по способам перемещения поглощаемых компонентов вдоль

адсорбционного слоя. Выделяют проявительный (или элюентный), фронтальный и вытеснительный методы. Рассмотрим их подробнее.

Методы перемещения пробы в неподвижной фазе.

К наиболее простым хроматографическим методам анализа относится фронтальный, при котором роль элюента сведена к минимуму. Предположим, что проба представляет собой растворитель Solv, в котором содержатся два компонента: А и В. Анализируемое вещество непрерывным потоком пропускается через сорбционную колонку. После прохождения через хроматографическое оборудование, измеряется концентрация А и В в выходном растворе и учитывается изначальный объем Solv. На основании полученных данных строится график зависимости, который и является выходной кривой (хроматограммой) (Рисунок 11).

Из-за поглощения неподвижной фазой компонентов А и В, из колонки сначала будет поступать растворитель, затем вещество с меньшим коэффициентом сорбции (допустим, А), и только потом В. В результате спустя некоторое время из хроматографического оборудования будет поступать раствор с неизменным составом (одинаковой пропорцией Solv, А и В). Данный хроматографический метод анализа применяется не только для изучения сложных веществ, но и для их очистки от примесей, при условии, что они поглощаются лучше, чем основные элементы реагента.

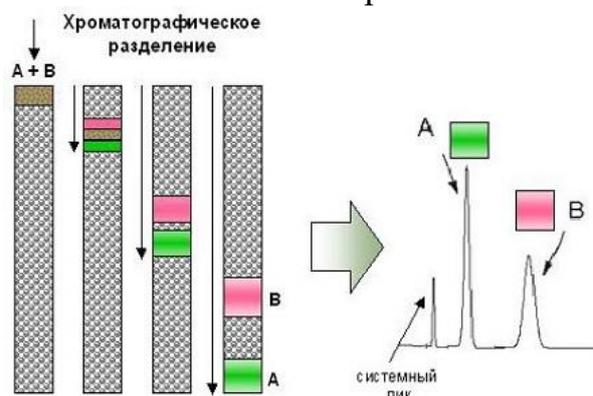


Рисунок 11 - Схема хроматографического разделения.

В лабораторных испытаниях чаще всего используется проявительный или элюентный хроматографический метод. Специалист добавляет в колонку пробу реагента Solv с растворенными в нем компонентами А и В, после чего под постоянным давлением подает подвижную фазу. Под воздействием физико-механических сил происходит разделение состава. Вещество с лучшей сорбируемостью займет верхнюю часть колонки, с меньшей — нижнюю. На выходе из оборудования сначала появится компонент А, затем чистый Solv, потом — элемент В, что и отразится в хроматограмме. Количественный анализ проводится измерением высоты и площади пиков: чем они больше, тем выше концентрация изучаемого вещества в составе.

Главное преимущество элюентного хроматографического метода заключается в возможности разделения сложных многокомпонентных

реактивов. Однако при изучении хроматограммы необходимо учитывать снижение концентрации выходящих растворов из-за разбавления подвижной фазой.

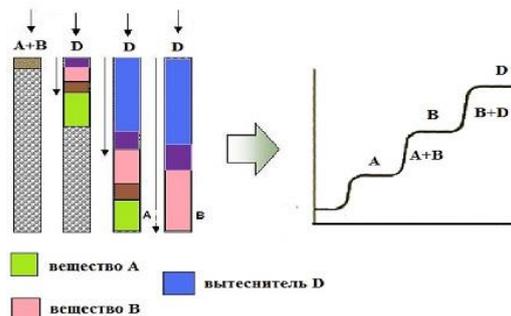


Рисунок 12 - Схема хроматографии с использованием вытеснителя.

Третий метод — вытеснительный. Он предполагает использование вытеснителя (препарата D) (Рисунок 12), который постоянно воздействует на раствор Solv, введенный в хроматографическую колонку. Коэффициент сорбции D должен быть выше, чем у любых компонентов анализируемой пробы. Благодаря этому препарат постепенно вытесняет вещество с худшей сорбируемостью, что и фиксируется при выходе смеси из колонки. Вытеснительный метод не требует применения газа-носителя, в результате чего сокращаются издержки на проведение исследований. Однако стоит помнить, что анализ полученных данных затрудняется из-за наложения зон разных веществ друг на друга, поскольку они не разделяются зоной растворителя.

Метод газожидкостной хроматографии.

В аналитической химии широко используется газожидкостный хроматографический метод. Благодаря разнообразию применяемых жидких неподвижных фаз, можно создать оптимальные условия для идентификации практически любого вещества, содержащегося в исследуемой пробе в незначительной концентрации. Это обуславливает универсальность метода. Для этого необходимо правильно настроить хроматографическое оборудование и подобрать неподвижную фазу, отвечающую следующим параметрам:

- высокая способность к растворению элементов, содержащихся в реактиве — в противном случае проба быстро выходит из колонки и не дает достаточный материал для проведения анализа;
- низкая летучесть — во время исследования фаза не должна испаряться, поскольку это осложнит чтение хроматографического графика;
- химическая инертность — адсорбент не должен вступать в реакции с компонентами пробы или газом-носителем;
- минимальная вязкость — в противном случае замедлится диффузия.

Также для реализации метода важна максимальная разделительная способность компонентов конкретной пробы.

Помимо выбора жидкой среды, в которой будет происходить разделение смеси на отдельные составляющие, во время подготовки хроматографического

анализа необходимо подобрать носитель неподвижной фазы. В качестве носителя используется твердый и прочный материал, на котором жидкость образует тонкую однородную пленку. Чаще всего применяется силанизированный хромосорбат, фторуглеродные полимеры и гранулы из высококачественного стекла. Данные носители отличаются следующими преимуществами:

- легко и равномерно смачиваются неподвижной фазой;
- практически не впитывают жидкость, то есть не препятствуют нормальному протеканию реакции между жидкой и газообразной средами;
- не реагируют на повышение температуры в рабочей колонке.

Хроматографические методы анализа, построенные по газожидкостному принципу, относятся к наиболее современным, и применяются в случае необходимости разделения веществ, относящихся к одному классу. Их активно используют в химической и нефтегазовой промышленности для контроля над качеством получаемой продукции. Среди ключевых преимуществ газожидкостного метода анализа можно выделить:

- экспрессность;
- максимальная точность;
- полная автоматизация;
- небольшие затраты на подготовку пробы и проведение исследования.

Для использования метода требуется подобрать не только жидкую среду и ее носитель, но и решить вопрос с непрерывной подачей элюента. Для минимизации расходов к хроматографу подключается генератор газа (например, водорода), который продуцирует нужное количество вещества и отвечает за его равномерную подачу в оборудование.

Жидкостно-жидкостный хроматографический метод.

По технологии выполнения жидкостно-жидкостный хроматографический метод анализа похож на газожидкостную хроматографию. На твердый носитель наносится жидкая среда, выступающая в роли неподвижной фазы. Для подготовки пробы используется не инертный газ, а раствор.

Изучаемый реагент вместе с потоком жидкого растворителя движется через сорбент, на поверхности которого происходит разделение компонентов. Чаще всего неподвижной фазой заполняют колонку хроматографа, но для некоторых исследований прибегают к методу тонкослойной хроматографии, при котором адсорбентом смачивают специальную бумагу.

Разделение осуществляется за счет распределения веществ между несмешивающимися растворами. То есть, концентрация одного и того же вещества в подвижной и неподвижной фазах будет различаться и зависеть от коэффициента распределения. Значения коэффициента устанавливаются эмпирически для каждого компонента, в результате чего жидкостно-жидкостные хроматографические методы анализа позволяют с высокой точностью идентифицировать отдельные элементы в сложном составе.

Для успешной реализации метода необходимо правильно выбрать несмешивающиеся фазы. Обычно они подбираются исходя из опыта прошлых анализов. Чаще всего применяются так называемые «тройные системы», в которые включены два несмешивающихся друг с другом растворителя и третья жидкость, растворимая в обеих фазах. Например, это может быть система из несмешивающихся гептанов и воды, в которую вводится хорошо растворимый в обеих средах этанол.

При выборе составов для подвижной и неподвижной фаз, следует учитывать, что их нерастворимость друг в друге относительна, и при проведении исследования вещества будут вступать во взаимодействие (пусть и в незначительном объеме), что сказывается на значениях, которые показывают хроматографические методы анализа. Для минимизации погрешности используется одна из двух технологий: предварительное насыщение подвижной фазы неподвижной или химическое закрепление жидкости на сорбенте.

Эффективность проведенного хроматографического анализа зависит также от выбора носителя для неподвижной фазы. Требования к нему следующие:

- развитая поверхность;
- химическая инертность;
- высокая способность к удержанию жидкости;
- устойчивость к используемым растворителям.

Чаще всего в жидкостно-жидкостных хроматографических методах исследования в качестве носителя выбирается целлюлоза, фторопласт, силикатные гели или полимеры.

Метод распределительной бумажной хроматографии.

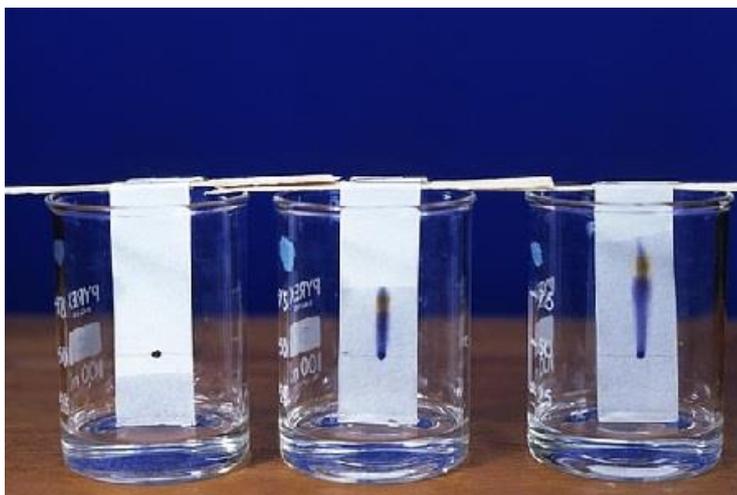


Рисунок 13 - Распределительная хроматография на бумаге.

Помимо вышеописанных носителей, заполняющих колонки, в распределительных хроматографических методах анализа может использоваться специальная бумага (Рисунок 13), на которой происходит разделение исследуемых компонентов. Данный метод редко применяется в

промышленных масштабах (по сравнению с колоночной хроматографией), но достаточно часто используется в аналитической химии.

Технология проведения бумажного хроматографического анализа предполагает вычисление коэффициента R_f , представляющего собой отношение смещения зоны компонента к смещению фронта раствора. В теории коэффициент зависит только от исследуемого вещества, растворителя и параметров бумаги. Однако в действительности при реализации метода на коэффициент также влияют компоненты, присутствующие в пробе в микроконцентрации, и используемая техника. В результате возникает определенная погрешность, которую необходимо учитывать при расшифровке анализа.

Распределительные хроматографические методы анализа чувствительны к характеристикам используемой бумаги. Она должна соответствовать следующим критериям:

- химическая чистота;
- нейтральность;
- инертность по отношению к реагентам в пробе;
- однородность.

При подборе материала учитывается также ориентация волокон, качество целлюлозы, сорбируемость. Параметры определяют скорость движения раствора и осаждения обнаруживаемых молекул.

В бумажном методе есть еще один нюанс — некоторые вещества могут поменять свойства носителя с гидрофильных на гидрофобные, что полностью нарушит ход эксперимента. В таком случае хроматографическая бумага предварительно пропитывается парафином или растительными маслами.

Растворители в распределительном методе.

Большое влияние на точность хроматографических методов анализа оказывает выбранный растворитель. В качестве подвижной фазы необходимо взять жидкость, которая в меньшей степени растворяет обнаруживаемые компоненты, чем неподвижная фаза. Если пренебречь данным условием, метод не сработает: при слишком высокой растворимости проба пройдет вместе с жидкостью, не адсорбируясь на поверхности, при слишком низкой — останется на начальной линии и не даст требуемую для расшифровки градацию.

Если с помощью распределительного метода анализируется водорастворимая смесь, в качестве неподвижной фазы берется очищенная вода, в качестве подвижной — любой удобный органический растворитель. Выбранные жидкости не должны смешиваться, менять свои свойства в процессе исследования, важна их доступность и нетоксичность для человека.

Распределительные хроматографические методы анализа основаны на использовании смешанных фаз: смесей спиртов друг с другом и органическими кислотами, аммиаком, водных растворов фенола или крезола и так далее. Меняя концентрацию, насыщенность и пропорции в растворе удается плавно

менять коэффициент R_f , создавать оптимальные условия для анализа, и получать дополнительные данные при расшифровке хроматограммы.

Как и прочие хроматографические методы анализа, бумажная хроматография определяет и качественный, и количественный состав пробы. В первом случае изучается специфическая окраска пятен на хроматограмме и анализируется числовое значение R_f для каждого обнаруживаемого реактива.

Для определения количественного состава смеси исследуется площадь образовавшихся пятен, интенсивность их окраски. Также применяют метод вымывания, при котором каждое цветное пятно обрабатывают экстрагентом и затем подсчитывают количество вымытого вещества.

Тонкослойный хроматографический метод.

Хроматографические методы анализа отличаются информативностью, сложностью проведения и актуальностью для решения практических промышленных задач. Одним из самых распространенных является метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) (Рисунок 14), разработанный группой ученых в 1938 году.



Рисунок 14 - Схема тонкослойной хроматографии.

Твердая фаза наносится тонким слоем на специально подготовленную стеклянную, металлическую или пластиковую пластину. Затем на ее край лаборант вносит анализируемую пробу и погружает пластинку в жидкий растворитель, выступающий в качестве подвижной фазы. Под действием капиллярных сил исследуемый состав начинает двигаться по сорбенту, разделяясь на свои компоненты. Диффузия в твердом неподвижном слое происходит в двух направлениях: продольном и поперечном, что дает дополнительные сведения для анализа.

Особенность хроматографического метода заключается в относительной простоте исполнения. Для проведения эксперимента требуются:

- Пластины для твердого адсорбента. Обычно подложки изготавливаются из алюминиевой фольги, полимерной пленки или стекла.
- Сорбент. Чаще других в данном методе применяются сорбенты из силикагеля, крахмала и целлюлозы.

- Растворитель. Выбор подвижной фазы зависит от физико-химических свойств твердого вещества и исследуемых реагентов. Как и в бумажном методе, допустимо использование многокомпонентных жидкостей.

После окончания работы перед построением хроматографического графика пластинку опрыскивают проявляющим реактивом либо подвергают воздействию ультрафиолета. Затем приступают к определению компонентов пробы и их дальнейшему изучению любым удобным для лаборанта методом.

Качественные и количественные методы анализа в ТСХ

Для качественного исследования пробы одним из самых надежных и показательных является «метод свидетелей». Вместе с составом на линию старта наносятся индивидуальные вещества («свидетели») — предполагаемые компоненты смеси. На все жидкости влияют одинаковые силы, поэтому совпадение коэффициента R_f одного из «свидетелей» с компонентом реагента позволяет предположить наличие в пробе данного вещества.

Что касается количественных определений в данном методе, то они выполняются непосредственно на пластине либо уже после снятия с нее слоя сорбента. В первом случае измеряется площадь цветового пятна и с помощью заранее подготовленного графика вычисляется количество вещества.

Однако более показательным считается спектрофотометрический метод. Сорбент удаляется с пластинки и помещается в специальное оборудование, которое и показывает процентное содержание различных компонентов с высокой точностью.

Ионообменный хроматографический метод.

Метод ионообменной хроматографии основан на замене элементарных частиц, входящих в реактив, на атомы, содержащиеся в ионообменнике. Поэтому результативность анализа зависит от параметров используемого оборудования. Современные ионообменники обладают важными преимуществами:

- Высокая обменная емкость.
- Воспроизводимые ионообменные свойства.
- Устойчивость к воздействию кислот и щелочей, любых сильных окислителей.

Для их производства чаще всего используются различные полимерные соединения: например, полистирол с разным набором функциональных групп, определяющим характерные свойства готового материала.

Ионообменный хроматографический метод применяется преимущественно для разделения элементарных частиц, после которого можно провести количественный подсчет анализируемых компонентов. Данная технология используется для обнаружения разнообразных анионов в питьевой и технической воде, продуктах переработки, пищевом, фармацевтическом и химическом сырье. Наиболее показателен метод для определения катионов щелочных и щелочноземельных металлов, и замещенных солей аммония.

Перспективы развития хроматографических методов

Хроматографические методы анализа постоянно совершенствуются и модифицируются. Появляются новые технологии, позволяющие определять компоненты смеси в наноконцентрациях. Благодаря этому удастся повысить качество готовой продукции в различных отраслях промышленности, минимизировать экологические риски за счет установления жесткого контроля над составом сточных вод.

Однако возможности хроматографии ограничены не только применяющимися методами, но и используемым оборудованием. Важно, чтобы хроматографы отвечали следующим требованиям:

- Простая подготовка и введение проб.
- Быстрое получение результатов и легкая расшифровка хроматографических графиков.
- Принцип работы, основанный на передовых методах.
- Максимальная точность анализа.
- Нивелирование погрешностей, возникающих из-за физико-химических свойств используемых подвижных и неподвижных фаз.
- Минимальные затраты на ввод оборудования в эксплуатацию и его дальнейшее обслуживание.
- Возможность анализа сырья или продукции без прерывания основного технологического процесса.
- Определение широкого спектра соединений, включая летучие углеводороды и другие сложные для обнаружения вещества.
- Быстрое обучение персонала методам работы с лабораторным оборудованием.

Дальнейшее совершенствование хроматографов позволит удешевить хроматографические методы анализа и расширить области их применения.

1.6. Практическое применение масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрия – это способ изучения веществ, вычислением массы и числа ионов при ионизации вещества.

Оборудование, которым производится масс-спектрометрия, является масс-спектрометр. Он анализирует образец и предоставляет данные в виде графиков (масс-спектров) (рисунок 15).

Таким путем можно исследовать любой материал, который поддается ионизации.

Широкое применение масс-спектрометрия приобрела в таких сферах, как:

- медицина и фармацевтика;
- генная инженерия и биохимия;
- химическая индустрия;
- пищевая индустрия;

- косметические и парфюмерные разработки;
- лабораторная диагностика для определения веществ в криминалистике, контроле на допинги, экологии;
- изготовление полимерных и пластиковых материалов;
- полупроводниковая индустрия;
- ядерная энергетика;
- металлургическое производство;
- нефтеперерабатывающая и нефтехимическая индустрия;
- биология, геология, гидрология, минералогия и другие отрасли.

Пути исследования масс-спектрометрией в разных сферах различаются в зависимости от того, какие данные необходимо получить в итоге.

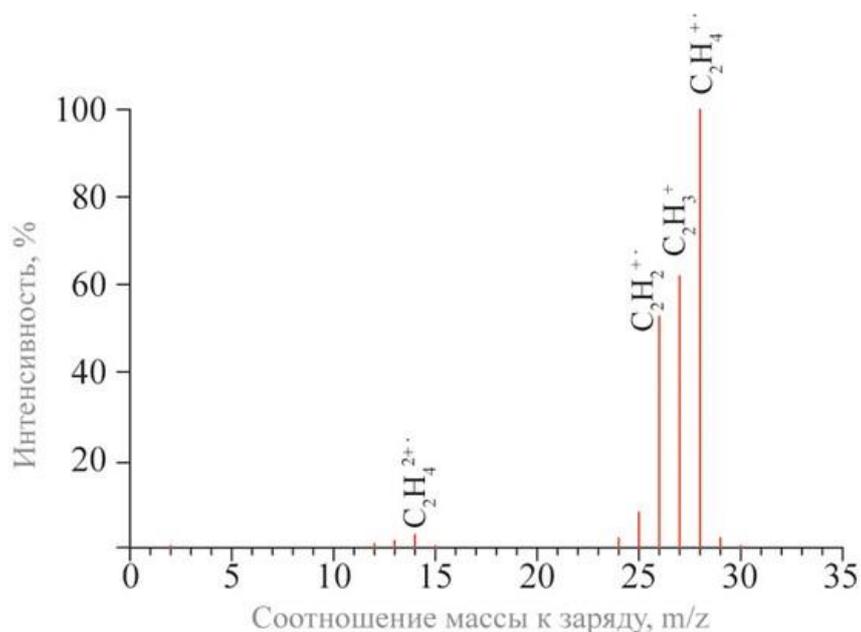


Рисунок 15 - Масс-спектр.

Масс-спектрометрией можно получить следующие данные:

- установить структуру соединения;
- исследование вещества на компоненты;
- установить возраст геологической породы по обследованию состава изотопов;
- хромато-масс-спектральный анализ для экологической сферы;
- исследовать ионизационные процессы, ионные реакции;
- измерять потенциал и энергию молекул.

Преимуществом метода масс-спектрометрии является то, что для исследования хватает совсем маленькое количество вещества.

Недостаток же состоит в разрушении материала, которое исследуется, т.е. анализируются продукты превращения.

Примечание. Масс-спектрометрический метод по сути не относится к спектрометрическому методу, так как отсутствует взаимодействие образца с электромагнитным излучением. Но из-за графического вида зависимости силы

ионного потока от отношения массы к заряду, который похож на спектр, этот метод и получил свое название.

Очень доступно и подробно масс-спектрометрия освещается в учебных пособиях, вроде Лебедев А.Т. «Масс-спектрометрия в органической химии».

Метод масс-спектрометрии заключается в последовательном выполнении следующих операций:

1. Ионизация вещества, а именно лишение молекул хотя бы одного иона. Масса его ниже массы молекулы во много раз, поэтому он никак не повлияет на результат исследования.

2. Разгон заряженных частиц в вакуумной среде в электрическом поле с последующим перемещением их в магнитное поле.

3. Анализ перемещения частиц в магнитном поле, а именно их скорость, искривление траектории движения. Больше заряженные частицы быстрее разгоняются и лучше реагируют на магнит. Частицы с большой массой не такие управляемые из-за инерции движения.

Примечание. Вакуум необходим для свободного перемещения заряженных частиц и предотвращая превращения их в назад в незаряженные.

Ионизация образцов может производиться несколькими путями и зависит от требуемой цели.

Существуют такие методы ионизации в масс-спектрометрии:

1. Электронный удар – приспособлен для изотопного и молекулярного анализа неорганических материалов.

2. Химическая ионизация – для изучения органических материалов.

3. Электроспрей.

4. Лазерное излучение.

5. Бомбардировка пучком ионов.

Последние три метода используются для исследования веществ с крупными молекулами.

Кроме того, способ ионизации разделяется еще на несколько видов по состоянию вещества перед исследованием, а именно газ, жидкость или твердое вещество.

Газовое состояние (фаза) образца проводится такими способами ионизации:

- электронная (изотопная масс-спектрометрия);
- химическая;
- электронный захват;
- ионизация в электрическом поле.

Жидкое состояние (фаза) образца проводится такими способами ионизации в масс-спектрометрии:

- термоспрей;
- на открытом воздухе;
- электроспрей;
- химическая на открытом воздухе;

- фотоионизация.

Твердое состояние (фаза) образца проводится такими способами ионизации:

- прямая лазерная десорбция;
- матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ масс-спектрометрия);
- масс-спектрометрия вторичных ионов (ионная масс-спектрометрия);
- бомбардировка быстрыми атомами;
- десорбция в электрическом поле;
- плазменная десорбция;
- ионизация в индуктивно-связанной плазме (масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой);
- термоионизация (поверхностная ионизация);
- ионизация в тлеющем разряде (искровая ионизация);
- ионизация в процессе лазерной абляции.

Последние четыре варианта являются достаточно жесткими, но без них невозможно получить ионы в пробах с очень прочными связями.

Очень широко практикуется метод масс-спектрометрии в гелиевых течеискателях, например, ПТИ-10, ТИ1-50 и другие.

Изучаемые системы или емкости заполняются гелием и потом с помощью масс-спектрометрического метода разыскиваются места, где через щели просачивается гелий.

Чувствительность масс-спектрометрического метода позволяет находить даже очень незначительные течи инертного газа в очень маленьком количестве, поэтому гелиевый масс-спектрометрический течеискатель является одним из самых точных и используемых приборов в промышленности.

Метод хромато-масс-спектрометрии – это tandemная масс-спектрометрия хроматографии и масс-спектрометрии, т.е. сочетание этих двух методов.

Хроматография занимается разбиением молекул на заряженные частицы, а масс-спектрометрия анализирует их.

Существует два вида хромато-масс-спектрометрии:

- газовая;
- жидкостная.

Определение методом хромато-масс-спектрометрией состава органических веществ, которые чаще всего многокомпонентные, является, пожалуй, единственным доступным методом. Самым лучшим считается совокупность газовой хроматографии и ионного детектора масс-спектрометра.

Именно поэтому хромато-масс-спектрометрия получила большое потребление в медицинской практике для диагностирования и анализа заболеваний и их возбудителей, в том числе определение микробиоценоза разных органов любого сосредоточения методом хромато-масс-спектрометрии

или масс-спектрометрия микробных маркеров биологических материалов (крови, мочы и прочем). Микробиоценоз методом хромато-масс-спектрометрии предоставляет возможность выявить множество микробов, которые невозможно определить другими методами, даже те, которые находятся в спящем состоянии в защитных капсулах. А, следовательно, люди получают возможность воспользоваться правильным и своевременным лечением, что невозможно переоценить.

Кроме этого, хромато-масс-спектрометрия обширно применяется в фармацевтике для создания новых лекарств, химической промышленности, экологической сфере для оценки проб окружающей среды, генной инженерии, техническом контроле разных областей промышленности, лабораторных обследованиях на присутствие в крови запрещенных препаратов и прочее.

Газовая хроматография масс-спектрометрия предусматривает добавление инертного газа-носителя (зачастую это гелий), который является подвижным элементом. Исследуемое вещество является неподвижным элементом.

Газовая масс-спектрометрия позволяет анализировать газы, жидкости и твердые вещества, у которых молекулярная масса ниже 400. Еще исследуемые вещества должны обладать требуемыми летучими, инертными и термостабильными свойствами.

Спектрометрический анализ протекает в масс-анализаторах и детекторах масс-спектрометров.

Масс-анализаторы бывают непрерывные и импульсные. Разнятся они тем, что поступление в них ионов проводится постоянно (непрерывно) или порциями, соответственно.

К непрерывным анализаторам принадлежат магнитный и квадрупольный, к импульсным – ионная ловушка, времяпролетный масс-анализатор и анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием.

Основная задача анализатора — это перераспределение ионов с разными параметрами движения (Рисунок 16).

После этого ионы попадают в детектор, который регистрирует разные спектры ионов.

Чаще всего в качестве детекторов используется диодный вторично-электронный умножитель или фотоумножитель. Первый регистрирует количественные показатели различных ионов пучками электронов, второй регистрирует мерцание от бомбардировки ионами люминофора.

Существуют также другие виды детекторов, это микроканальные множители, системы типа диодных матриц и коллекторы.

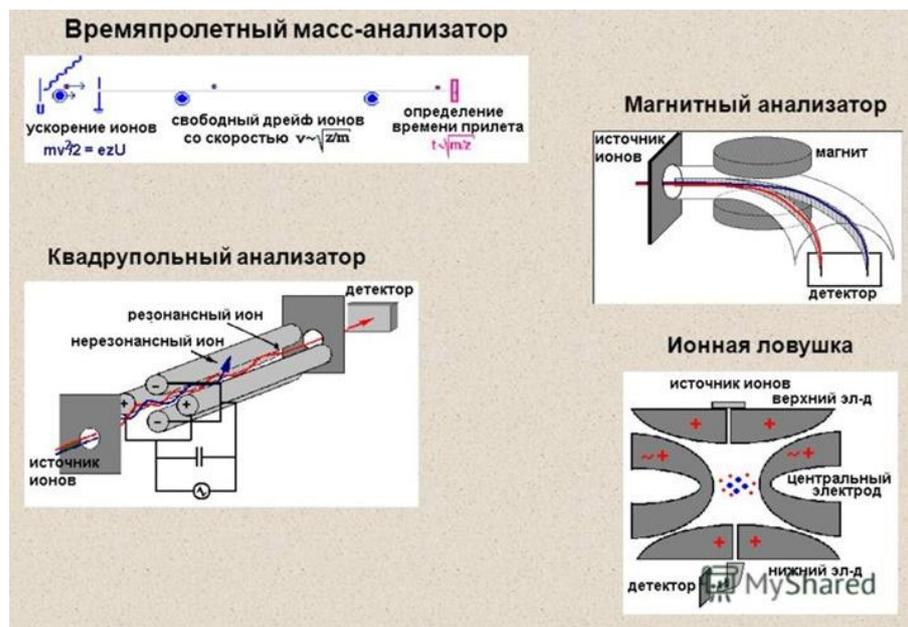


Рисунок 16 - Схема разделения ионов.

Масс-спектрометром называется вакуумное оборудование, которое способно анализировать вещество по законам перемещения заряженных частиц в магнитном и электрическом поле (Рисунок 17).

В упрощенном виде описание масс-спектрометра можно представить так: основные компоненты прибора – это ионный источник, масс-анализатор и детектор.

Ионный источник превращает обычные молекулы пробного образца в заряженные частицы и помещает их в электрическое и магнитное поле для ускорения.

Масс-анализатор делит ионы на группы по скорости движения, а именно по времени перемещения на какое-то расстояние.

Детектор регистрирует данные по относительному количеству каждой группы.



Рисунок 17 - Блок-схема масспектрометра.

Кроме основных компонентов масс-спектрометр оснащается еще вакуумными установками с насосом и вентилятором для выработки вакуума, манометром, системой для установки пробного образца, электронной схемой, индикаторами, стабилизатором и прочим.

В зависимости от ионизации вещества, масс-спектрометры бывают статическими и динамическими.

Также существуют масс-спектрометры с двумя масс-анализаторами, т.е. тандемные спектрометры. Они используются в основном при мягких способах ионизации.

Применения масс-спектрометрии

Разработка новых лекарственных средств для спасения человека от ранее неизлечимых болезней и контроль производства лекарств, генная инженерия и биохимия, протеомика. Без масс-спектрометрии немислим контроль над незаконным распространением наркотических и психотропных средств, криминалистический и клинический анализ токсичных препаратов, анализ взрывчатых веществ.

Выяснение источника происхождения очень важно для решения целого ряда вопросов: например, определение происхождения взрывчатых веществ помогает найти террористов, наркотиков — бороться с их распространением и перекрывать пути их трафика. Экономическая безопасность страны более надёжна, если таможенные службы могут не только подтверждать анализами в сомнительных случаях страну происхождения товара, но и его соответствие заявленному виду и качеству. А анализ нефти и нефтепродуктов нужен не только для оптимизации процессов переработки нефти или геологам для поиска новых нефтяных полей, но и для того, чтобы определить виновных в разливах нефтяных пятен в океане или на земле.

В эпоху «химизации сельского хозяйства» весьма важным стал вопрос о присутствии следовых количеств применяемых химических средств (например, пестицидов) в пищевых продуктах. В мизерных количествах эти вещества могут нанести непоправимый вред здоровью человека.

Целый ряд техногенных (то есть не существующих в природе, а появившихся в результате индустриальной деятельности человека) веществ являются супертоксикантами (имеющими отравляющее, канцерогенное или вредное для здоровья человека действие в предельно низких концентрациях). Примером являются хорошо известные диоксины.

Существование ядерной энергетики немисливо без масс-спектрометрии. С её помощью определяется степень обогащения расщепляющихся материалов и их чистота.

Конечно, и медицина не обходится без масс-спектрометрии. Изотопная масс-спектрометрия углеродных атомов применяется для прямой медицинской диагностики инфицированности человека *Helicobacter pylori* и является самым надёжным из всех методов диагностики. Также масс-спектрометрия применяется для определения наличия допинга в крови спортсменов.

Трудно представить область человеческой деятельности, где не нашлось бы места масс-спектрометрии. Ограничимся просто перечислением: аналитическая химия, биохимия, клиническая химия, общая химия и органическая химия, фармацевтика, косметика, парфюмерия, пищевая промышленность, химический синтез, нефтехимия и нефтепереработка, контроль окружающей среды, производство полимеров и пластиков, медицина и токсикология, криминалистика, допинговый контроль, контроль наркотических средств, контроль алкогольных напитков, геохимия, геология, гидрология, петрография, минералогия, геохронология, археология, ядерная промышленность и энергетика, полупроводниковая промышленность, металлургия.

Проточная цитометрия: принципы метода и практическое применение

Если вы попросите ученого или клинициста, работающего с культурами клеток, назвать наименее трудоемкий метод анализа клеточных популяций, дающий быстрый и информативный результат, ответ будет однозначным: проточная цитометрия.

Принципы проточной цитометрии

По-научному, проточная цитометрия, или flow cytometry – это метод регистрации оптических параметров находящихся в потоке клеток или частиц по сигналам светорассеяния и флуоресценции в режиме поштучного анализа.

Для фокусировки клеток в потоке жидкости используется гидродинамическое или акустическое фокусирование, с помощью которого клетки выстраиваются в потоке в ряд, одна за другой. В проточной ячейке клетки облучаются лазером, оптика цитометра собирает световой сигнал от клеток, а электроника преобразует и оцифровывает сигнал для дальнейшего анализа.

В проточной цитометрии измеряются следующие параметры:

- прямое светорассеяние (рассеяние света под малым углом, FSC) для определения относительного размера клеток или частиц;
- боковое светорассеяние (рассеяние света под прямым углом, SSC) для оценки неоднородности внутриклеточного содержимого клетки (например, размеры ядра и гранулярность цитоплазмы);
- флуоресценция – для изучения клеточных маркеров с помощью меченных флюорохромными красителями антител к поверхностным и внутриклеточным компонентам клеток. При этом по интенсивности флуоресценции можно судить об экспрессии антигенов (количестве рецепторов) на клетках.

Применение проточной цитометрии.

Самое простое приложение проточной цитометрии (Рисунок 18) – подсчет клеток и оценка их жизнеспособности. Для этого используются классические красители на жизнеспособность, например, наборы LIVE/DEAD kit. Набор состоит из одного или нескольких красителей, которые позволяют отличить

мертвые клетки или клетки с нарушенной целостностью клеточной мембраны от живых клеток.

Проточную цитометрию можно использовать для анализа клеточного цикла. Различные стадии клеточного цикла отличаются по содержанию ДНК в клетке. Наборы для анализа клеточного цикла содержат ДНК-связывающие красители, интенсивность флуоресценции которых пропорциональна количеству ДНК. С помощью гистограммы интенсивности флуоресценции можно выделить клетки в G₀/G₁, S и G₂/M фазах клеточного цикла.

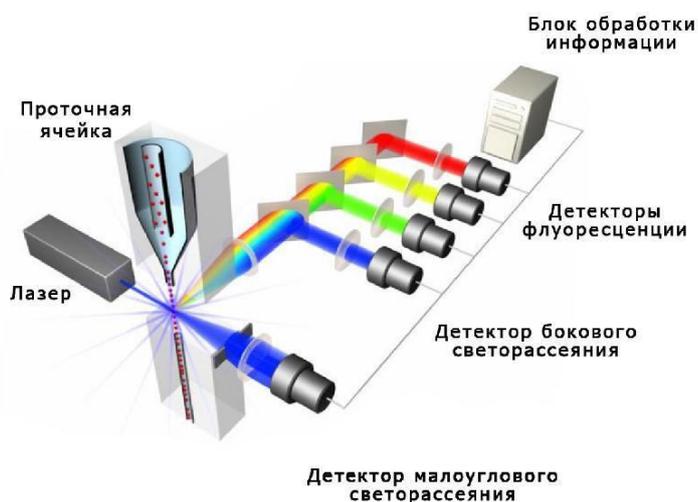


Рисунок 18 - Схема проточного цитометра.

Анализ апоптоза основан на связывании Аннексина V с фосфотидилсерином на поверхности апоптотирующих клеток. На ранних стадиях апоптоза молекулы фосфотидилсерина перемещаются на внешнюю сторону клеточной мембраны и способны связываться с Аннексином V. На поздних стадиях апоптоза клетки теряют целостность клеточной мембраны и поглощают краситель, который иначе не смог бы проникнуть через клеточную мембрану.

Для анализа различных стадий апоптоза проводят определение активированных каспаз в сочетании с красителем, окрашивающим мертвые клетки.

Проточная цитометрия в иммунологии активно используется для иммунофенотипирования клеток крови, позволяет идентифицировать внутриклеточные белки, оценить степень цитотоксичности, и многое другое.

Проточная цитометрия в клинической лабораторной диагностике.

Достаточно быстро проточная цитометрия стала рутинным методом в диагностических лабораториях клиник.

На сегодняшний день проточные цитометры, зарегистрированные Росздравнадзором, в лабораторной диагностике активно используют для оценки иммунного статуса пациента (для этого используют такие поверхностные маркеры, как CD3, CD4, CD8, CD 19, CD 20, CD22 и т.д.) (Рисунок 19), оценку иммунологического фенотипа нормальных и опухолевых

клеток для своевременной постановки диагноза, а также отслеживание острых лейкозов в ходе лечения. Большой вклад проточная цитометрия внесла в диагностику гемобластозов.

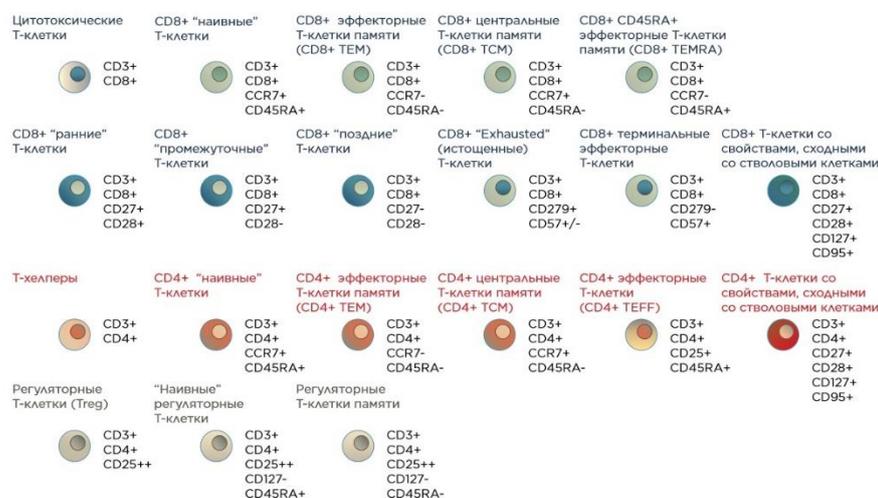


Рисунок 19 - Субпопуляции Т-клеток периферической крови и поверхностные антигены, применяемые для их выявления.

* только для научных исследований, не для клинической диагностики.

Примеры применения проточной цитометрии:

- Многоцветное иммунофенотипирование.
- Оценка жизнеспособности клеток и выявление апоптоза с помощью конъюгатов с иодидом пропидия (PI) и аннексином V.
- Внутриклеточное обнаружение цитокинов и факторов транскрипции.
- Измерение секреции цитокинов с помощью наборов по анализу секреции цитокинов (MACS® Cytokine Secretion Assays).
- Анализ клеточного цикла с использованием иодида пропидия (PI) и/или бромдезоксисуридина (BrdU).
- Анализ микровезикул.
- Подсчет клеток.
- Измерение транспорта ионов (например, ионов кальция).
- Обнаружение активных форм кислорода и активных форм азота (окись азота; NO) с помощью флуоресцентных индикаторов H2DCFDA и DAF-FM diacetate, соответственно.
- Анализ клеточной пролиферации с помощью флуоресцентных меток CFSE или CMFDA.
- Определение флуоресцентных репортерных белков: GFP, CYP, YFP, tdTomato, mCherry, RFP.
- Анализ вирусных частиц, бактерий, митохондрий.

1.7. Полимеразная цепная реакция в реальном времени и ее практическое применение.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (или количественная ПЦР, кПЦР, ПЦР-РВ, англ. *Real-time PCR, qPCR*) — лабораторный метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, позволяющий определять не только присутствие целевой нуклеотидной последовательности в образце, но и измерять количество её копий. Количество амплифицированной ДНК измеряется после каждого цикла амплификации с помощью флуоресцентных меток: зондов или интеркаляторов. Оценка может быть количественной (измерение количества копий матрицы) и относительной (измерение относительно внесённой ДНК или дополнительных калибровочных генов).

Модифицированный метод количественного ПЦР называется **полуколичественной ПЦР** (пкПЦР, англ. *semi-quantitative PCR*). Он часто используется для сравнения экспрессии нескольких генов. В данном случае измеряют количество накопленного продукта только в одной точке — после остановки реакции.

Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с другими методами: ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией, англ. *RT-qPCR*), ChIP-кПЦР и др.

Процедура кПЦР похожа на процедуру классической ПЦР, то есть присутствуют все стадии реакции — плавление двухцепочечных ДНК при температуре 95°C, отжиг праймеров (температура отжига зависит от используемых праймеров) и элонгация при температуре 72°C, если используется Taq-полимераза. Количество ПЦР-продукта измеряется в каждом цикле ПЦР с помощью флуоресцентных меток. Таким образом, сила сигнала говорит о первоначальном количестве интересующей молекулы (Рисунок 20).



Рисунок 20 - График амплификации в кПЦР

Номенклатура, обычно используемая для кПЦР:

1. Базовая линия — это циклы ПЦР, в которых флуоресцентный сигнал ниже значения, которое может зарегистрировать прибор.

2. ΔR_n — приращение флуоресцентного сигнала в каждый момент времени.

3. Пороговая линия — это произвольный уровень флуоресценции, выбранный на основе базовой линии. Сигнал, который обнаружен выше порога, считается реальным сигналом, который можно использовать для определения порогового цикла (C_t) для образца. Порог можно регулировать для каждого эксперимента, чтобы он находился в области экспоненциального роста на всех графиках.

4. Пороговое число циклов (C_t) — это число циклов ПЦР, при котором флуоресценция превышает пороговое значение (Рисунок 21).

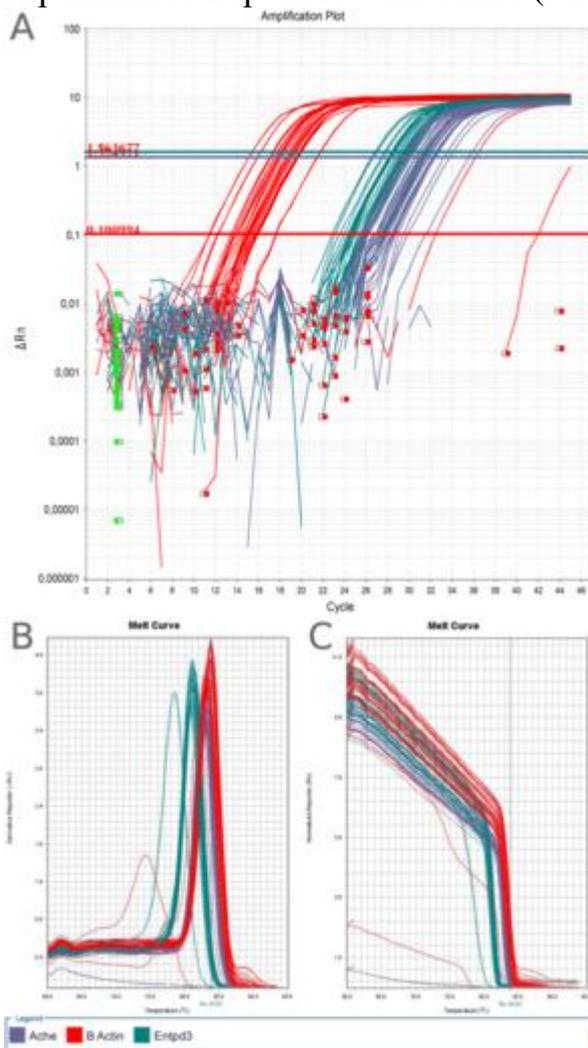


Рисунок 21 - График состоит из базовой линии, экспоненциальной фазы и плато.

A — график амплификации. Зависимость уровня флуоресценции от цикла ПЦР для нескольких образцов. **B** — кривая плавления. На оси ординат производная флуоресценции по температуре со знаком минус, на оси абсцисс — температура. **C** — кривая плавления.

Уровень флуоресценции по времени.

На начальных этапах флуоресценция слабая, так как продукта мало, поэтому её трудно отличить от фона. По мере накопления продукта, сигнал растёт сначала экспоненциально, а затем выходит на плато. Выход на плато объясняется нехваткой того или иного компонента реакции — могут закончиться праймеры, нуклеотидилтрифосфаты, флуоресцентная метка. Если продукта реакции накопилось слишком много, то лимитирующим фактором может стать полимеразы, и тогда зависимость количества продукта от цикла станет линейной. Стоит отметить, что в стандартной реакции ПЦР в реальном времени все образцы выйдут на плато и достигнут примерно одного уровня сигнала. Таким образом, конечная точка ничего не скажет о начальном количестве исследуемого образца. С другой стороны, в экспоненциальной фазе можно проследить отличия в скорости роста количества продукта. Различия в начальном количестве молекул влияют на количество циклов, необходимых для поднятия уровня флуоресценции выше уровня шума.

C_t — число, по которому можно судить о количестве целевой ДНК в растворе, но C_t -величина может зависеть от многих случайных факторов, например, чувствительности детектора, качества фильтра и пр. Поэтому точное начальное количество интересующего продукта измерить нельзя. Для решения этой проблемы существуют методы нормировки. Измеряют отношение количеств двух молекул в пробе. Нормируют обычно на продукты генов домашнего хозяйства — генов, количество которых в клетке всегда примерно одинаковое (пример — ген *infA*, кодирующий фактор инициации трансляции у бактерий).

Анализ кривой плавления

ПЦР в реальном времени позволяет идентифицировать конкретные амплифицированные фрагменты ДНК, используя анализ их температуры плавления (денатурации), также называемый величиной T_m . В методе используются интеркалирующие красители, обычно это SYBR Green. Температура плавления ДНК специфична для амплифицированного фрагмента. Результаты этого метода получены путём сравнения кривых диссоциации анализируемых образцов ДНК. Для анализа строится две кривые плавления. Первая — это зависимость флуоресценции по времени, вторая — скорость падения флуоресценции по времени. Пик отражает определённый образец ДНК.

Классификация используемых флюорофоров.

Неспецифическое определение: количественная ПЦР с двухцепочечными ДНК-связывающими красителями в качестве репортеров.

В данном случае меткой служит химическое соединение, способное внедряться в двойную спираль ДНК. Такой зонд меняет свою конформацию при взаимодействии с продуктами ПЦР и становится флюорофором. Определение продукта можно проводить в конце каждого цикла, перед стадией денатурации. Примером такой краски может служить широко используемый

SYBR Green. Однако красители двухцепочечных ДНК(дцДНК) будут связываться со всеми дцДНК, включая неспецифические продукты ПЦР (такие как димер праймера) (Рисунок 22). Это может потенциально помешать точности мониторинга целевой последовательности.



Рисунок 22 - Специфическое определение: флуоресцентный репортерный зонд

кПЦР с использованием флуоресцентного зонда

Флуоресцентные зонды обнаруживают только ДНК-содержащую последовательность, комплементарную зонду; следовательно, использование репортерного зонда значительно повышает специфичность и позволяет повысить точность измерения в присутствии других дцДНК. Однако флуоресцентные репортерные зонды не предотвращают ингибирующий эффект димеров праймера, которые могут подавлять накопление целевых продуктов реакции.

Можно также использовать несколько зондов, у которых флюорофоры имеют разные спектры испускания. В таком случае появляется возможность в одной пробирке зарегистрировать сигнал от разных молекул ДНК. Метод носит название множественной ПЦР (англ. multiplex PCR).

Метод основан на введении комплементарного продукту амплификации ДНК-зонда с флуоресцентным репортером на одном конце зонда и гасителем флуоресценции на противоположном. Когда гаситель находится в непосредственной близости от репортера, он поглощает сигнал и репортер не даёт флуоресценции. Во время амплификации целостность зонда нарушается и репортер можно обнаружить по флуоресценции после возбуждения лазером. Следовательно, увеличение количества продукта, с которым связывается репортерный зонд в каждом цикле ПЦР, вызывает пропорциональное увеличение флуоресценции. Метки могут флуоресцировать в фазе элонгации или в фазе отжига ПЦР.

• Метки, работающие в фазе элонгации:

На зонд с 5' и 3' концов пришиты флуорофор и его гаситель. Если последовательность зонда не очень длинная, то даже в связанном с ДНК состоянии они будут взаимодействовать друг с другом, и не будет испускаться флуоресценция. Во время элонгации ДНК-полимераза, обладающая 5'-3'-

экзонуклеазной активностью (часто используется Taq-полимераза), по одному нуклеотиду диссоциирует зонд от ДНК-мишени. В результате этого процесса и флуорофор, и его гаситель попадут в раствор, где вероятность нахождения этих веществ рядом будет небольшой, и флуоресценция восстановится.

• Метки, работающие в фазу отжига:

1. Флуорогенная шпилька — небольшая одноцепочечная молекула ДНК, которая в свободном состоянии способна образовывать особую пространственную структуру ДНК-шпильку. На один конец цепочки пришивают флуорофор, а на второй — вещество, его гасящее. Последовательность зонда комплементарна ДНК-мишени. В таком случае те молекулы зонда, которые плавают в растворе, не будут давать флуоресцентный сигнал, а связавшиеся с молекулами ДНК будут претерпевать конформационные изменения, в результате которых произойдёт пространственное разнесение флуорофора и его гасителя и восстановление флуоресценции. Регистрацию целесообразно проводить после денатурации.

2. Метка, основанная на методе FRET. Основа этого метода — наличие двух зондов, которые связываются с ДНК-мишенью на небольшом расстоянии друг от друга. На 5'-конец одного зонда и 3'-конец второго пришиты флуорофор-донор и флуорофор-акцептор, соответственно. При их близком расположении флуорофор-донор поглощает свет определённой длины волны и испускает свечение в более длинноволновом спектре. Эту волну, в свою очередь, поглощает флуорофор-акцептор и испускает регистрируемый свет.

ПЦР в реальном времени широко используется для решения многих исследовательских задач в лабораториях. Кроме того, этот метод нашёл применение в медицине (для диагностики заболеваний) и в сфере биотехнологий (для определения содержания микроорганизмов в продуктах питания и растительных материалах; для детекции ГМО). Также кПЦР используется для генотипирования вирусов и других патогенов человека и определения их количественного содержания.

Научные исследования.

Количественная оценка экспрессии генов.

кПЦР используется как один из способов количественных измерений транскрипции генов. Данный метод широко применяется для оценки изменений во времени предельного гена, например, в ответ на введение лекарственного средства или изменения условий окружающей среды. Количественная оценка экспрессии генов с помощью традиционных методов обнаружения ДНК ненадёжна. Обнаружение мРНК с помощью нозерн-блота, или продуктов ПЦР на геле, или саузерн-блота не позволяет провести точное количественное определение. Например, в течение 20-40 циклов типичной ПЦР количество продукта ДНК достигает плато, которое напрямую не связано с количеством ДНК-мишени в начальной ПЦР.

ПЦР в реальном времени может быть использована для количественной оценки нуклеиновых кислот двумя распространёнными методами: относительной количественной оценки и абсолютной количественной оценки. Абсолютное количественное определение даёт точное количество целевых молекул ДНК с использованием калибровочной кривой. Поэтому важно, чтобы ПЦР образца и стандарта имели одинаковую эффективность амплификации. Относительная количественная оценка основана на внутренних эталонных генах (генов домашнего хозяйства) для определения кратных различий в экспрессии целевого гена. Количественная оценка выражается как изменение уровней экспрессии мРНК, интерпретируемой как комплементарная ДНК (кДНК, генерируемая обратной транскрипцией мРНК). Относительную количественную оценку легче выполнить, поскольку она не требует калибровочной кривой, поскольку количество изучаемого гена сравнивается с количеством контрольного гена.

кПЦР для определения количества малых ядерных РНК (мяРНК)

Малые ядерные РНК (мяРНК) отличаются по свойствам от мРНК очень малой длиной (около 22 нуклеотидов), не имеют консервативной последовательности на концах, при этом мяРНК одной популяции могут отличаться на один или несколько нуклеотидов. Для решения этих проблем используют подходы, основанные на добавлении небольшого участка ДНК (линкера) к кДНК в реакции обратной транскрипции. Затем проводится ПЦР в реальном времени стандартными способами с использованием праймеров, (биология) комплементарных линкеру.

Геномные исследования с применением ChIP-qPCR

Иммунопреципитация хроматина (ChIP) в сочетании с RT-qPCR считается базовым методом в геномных исследованиях, его коммерческая доступность и высокая точность позволяет быстро и легко анализировать взаимодействия белок-ДНК. ChIP-qPCR применяют для исследований конкретных генов и потенциальных регуляторных областей, таких как промоторы. Этот метод в настоящее время используется в разных исследованиях, включая клеточную дифференцировку, молчание генов-супрессоров и влияние модификаций гистонов на экспрессию генов.

Анализ ChIP охватывает только часть возможных мишеней, присутствующих по всему геному из-за вариабельности эффективности сшивания и стерического ограничения доступности антител.

Для проведения ChIP-qPCR необходимо добавить master mix (смесь ферментов и нуклеотидов), праймеры и матричную ДНК. При этом нужно точно подобрать концентрацию праймеров для эффективной амплификации целевой ДНК. В качестве матрицы выступает либо ChIP ДНК, либо, в случае отрицательного контроля, пустые бусины без ДНК. Затем необходимо подобрать время и температуру циклов отжига, и запустить ПЦР. Результаты анализируют аналогично результатами кПЦР, сравнивая пороговое число циклов (Ct) для матрицы ввода и матрицы ДНК ChIP.

Медицинская диагностика

Количественная ПЦР применяется для быстрого выявления генов или фрагментов ДНК, являющихся маркерами инфекционных заболеваний, генетических отклонений и т.д. Внедрение этого метода в клинические лаборатории значительно улучшило качество диагностики инфекционных заболеваний. Кроме того, кПЦР используется в качестве инструмента для детектирования вновь возникающих заболеваний. Например, новых штаммов гриппа.

Использование кПЦР также позволяет проводить количественные измерения и генотипирование (характеристика штаммов) вирусов, например, вируса гепатита В. Степень инфекции, которая оценивается, как число копий вирусного генома на единицу ткани пациента, имеет большое значение. Например, вероятность реактивации вируса простого герпеса типа 1 зависит от количества инфицированных ганглиев.

У пациентов с подозрением на коронавирусную инфекцию забирают мазок из горла, экстрагируют РНК и анализируют методом RT-qPCR. Целевыми генами является открытая рамка считывания 1ab (ORF1ab) и нуклеокапсидный белок (N). Пороговое значение цикла (значение Ct) менее 37 определяют как положительный результат теста, а значение Ct 40 или более как отрицательный результат теста. Данные диагностические критерии основаны на рекомендации Национального института контроля и профилактики вирусных заболеваний.

Чувствительность RT-qPCR теста составляет 83,3%, данный тест склонен к ложноотрицательным результатам. Для диагностики коронавируса также используют компьютерную томографию, чувствительность которой значительно выше и составляет 97,2%.

Количественная ПЦР также широко используется для выявления опухолевых клеток в материале из твёрдых опухолей и даже при некоторых формах лейкемии.

кПЦР помогает выявлению циркулирующих опухолевых клеток. Так, например, рак молочной железы все ещё является наиболее частой причиной смерти среди раковых больных. Причём часто смерть вызвана возникшими метастазами. Метастазы возникают в результате того, что клетки, способные к пролиферации, отделяются от опухоли, выходят в кровяное русло и вторично поселяются в какой-то части организма. Эти клетки называются циркулирующими стволовыми клетками (ЦСТ). Присутствие таких клеток в крови пациентов, больных раком молочной железы, как правило, связано с плохим прогнозом исхода терапии и выживаемости в целом, поэтому является очень важным диагностическим параметром. Но из-за очень низкого количества, выявление ЦСТ — трудная задача.

И кПЦР как высокочувствительный метод может быть использован для решения этой проблемы. ЦСТ имеют эпителиальное происхождение и, следовательно экспрессируют определённый набор генов, отличающийся от окружающих их клеток крови, имеющих мезенхимальное происхождение. Для

применения этого метода необходимо определить набор генов-маркеров ЦСТ и оценить их уровень экспрессии.

В микробиологии

ПЦР в реальном времени также применяется для микробиологических работ в сфере безопасности продуктов питания, для оценки качества вод (питьевых и сточных) и в сфере здравоохранения. Кроме того, данный метод используется для идентификации кишечной микрофлоры.

Обнаружение фитопатогенов

Агропромышленность производит семена и рассаду, не содержащую патогенных микроорганизмов, с целью предотвращения экономических потерь и увеличения срока хранения продукции. Поэтому были разработаны системы, позволяющие обнаружить небольшие количества ДНК фитотторы (*Phytophthora ramorum*), оомицетов и некоторых других патогенов, которые приводят к гибели дубов и других видов растений, в смеси с ДНК растения-хозяина. Возможность различить ДНК возбудителя и растения-хозяина основана на амплификации последовательностей ITS (internal transcribed spacer), внутренних транскрибируемых участков, расположенных в кодирующей области гена рибосомной РНК, которые характерны для каждого таксона.

Выявление генетически модифицированных организмов

кПЦР (с использованием обратной транскрипции) может быть использована для детекции генетически модифицированных организмов, так как является более чувствительным по сравнению со многими другими методами. При этом специфические праймеры используются для амплификации промотора, терминатора или промежуточных последовательностей, используемых в процессе создания вектора. Так как процесс создания трансгенного растения обычно приводит к вставке более чем одной копии трансгена, его количество также обычно оценивается с помощью кПЦР. При этом в качестве контроля используют растение, содержащее данный ген в единственном экземпляре.

Суть метода ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR – polymerase chain reaction) – метод получения множества копий определенных фрагментов ДНК (генов) в биологическом образце.

Сущность ПЦР как метода молекулярной биологии заключается в многократном избирательном копировании определённого гена (участка ДНК) при помощи специальных ферментов в условиях *in vitro*. Важной особенностью ПЦР является получение копий конкретного участка ДНК (гена), соответствующего заданным условиям. Синонимом процесса копирования ДНК является «амплификация». Репликация ДНК *in vivo* также может считаться амплификацией. Однако в отличие от репликации, в процессе полимеразной

цепной реакции амплифицируются короткие участки ДНК (максимум 40000 пар нуклеотидов).

Основные принципы

Итак, ПЦР - это многократное копирование определенных фрагментов ДНК *in vitro* в процессе повторяющихся температурных циклов. Как же протекает процесс реакции в пределах одного температурного цикла?

Образование нуклеотидной цепи осуществляется ферментом ДНК-полимеразой. Однако для начала работы ферменту необходима стартовая площадка. В качестве площадок выступают "праймеры" (затравки) - синтетические олигонуклеотиды длиной 15-20 нуклеотидов. Праймеров должно быть два (прямой и обратный), они комплементарны участкам ДНК-матрицы и именно фрагмент ДНК, ограниченный праймерами, будет многократно копироваться ДНК-полимеразой. Работа полимеразы заключается в последовательном добавлении нуклеотидов, комплементарных последовательности ДНК-матрицы. Тем самым в одном температурном цикле вновь синтезируется два новых фрагмента ДНК (т.к. молекула ДНК - двуцепочечная, то и матриц изначально две). Таким образом, за 25-35 циклов в пробирке накапливаются миллиарды копий участка ДНК, определенного праймерами. Структуру отдельного цикла можно представить следующим образом:

1. денатурация ДНК (плавление, расхождение цепей ДНК) - 95°C - 1 или 2 минуты;
2. отжиг праймеров (затравки связываются с ДНК-матрицей, температура данной стадии определяется нуклеотидным составом праймера) - 60°C (к примеру) - 1 минута;
3. элонгация ДНК (полимераза синтезирует цепь ДНК) - 72°C - 1 минута (время зависит от длины синтезируемого фрагмента).

Приборная база для применения метода полимеразной цепной реакции в лаборатории должна состоять из:

1. амплификатора(или, как его еще называют, термоциклера);
2. системы для гель-электрофореза с источником питания (для визуализации результатов ПЦР);
3. системы гель-документации (для анализа результатов ПЦР);
4. ПЦР-бокса(для пробоподготовки);
5. вортекса;
6. микроцентрифуги;
7. Набора автоматических дозаторов (механических или электронных).

Помимо основного и вспомогательного оборудования для полноценного функционирования ПЦР-лаборатории, необходимы некоторые расходные материалы: стерильные наконечники, пробирки, штативы для пробирок и дозаторов.

Реагентная база в обычной ПЦР-лаборатории для проведения полноценной полимеразной цепной реакции включает в себя фермент ДНК-полимеразу с буфером, праймеры (небольшие синтетические фрагменты ДНК, комплементарные началу и концу анализируемого участка ДНК-матрицы), смесь нуклеотидов (А, Т, Г, Ц). Также абсолютно необходима очищенная вода.

Достоинства метода ПЦР.

Высокая чувствительность исследования.

Чувствительность метода такова, что амплифицировать в ПЦР и выявить целевую последовательность можно даже в том случае, если она встречается однажды в образце из 10^5 клеток.

Специфичность анализа.

ПЦР позволяет выявлять ДНК конкретного инфекционного агента в присутствии ДНК других микроорганизмов и ДНК организма-хозяина, а также проводить генотипирование. Специфически подбирая компоненты реакции (праймеры), Вы можете одновременно выявлять ДНК близкородственных микроорганизмов.

Универсальность метода ПЦР.

Дело в том, что для ПЦР-диагностики инфекционных заболеваний, либо наследственных заболеваний человека можно использовать одно и то же оборудование, следовать универсальным процедурам подготовки образцов (проб) и постановки анализа, а также однотипные наборы реактивов.

Экономия времени.

Важное преимущество ПЦР – отсутствие стадий культуральной микробиологической работы. Подготовка образцов, проведение реакции и анализ результатов максимально облегчен и во многом автоматизирован. Благодаря этому, время получения результата может сокращаться до 4-5 часов.

Эффективность метода ПЦР.

ПЦР помогает избежать известных сложностей, возникающих при выращивании труднокультивируемых, некультивируемых или персистирующих форм микроорганизмов для диагностики латентных и хронических инфекций. Эффективен метод ПЦР и при скрининге возбудителей с высокой антигенной изменчивостью, а также внутриклеточных паразитов.

Широта исследуемого клинического материала.

В качестве образца при полимеразной цепной реакции может быть использован не только биологический материал от больного, но также и многие другие субстраты, в которых могут быть идентифицированы молекулы ДНК с высокой чувствительностью, например, вода, почва, продукты питания, микроорганизмы, смывы и многое другое.

Все перечисленные выше достоинства этого уникального метода - высокая чувствительность и специфичность, идентификация инфекционного агента и проведение генотипирования любого гена человека, высокая эффективность и экономия времени, универсальность приборной базы – позволяют широко

применять сегодня метод ПЦР в клинической диагностике, медицинской практике, научных исследованиях, контроле качества и многих других областях.

Применение ПЦР

Области применения полимеразной цепной реакции как современного метода молекулярной биологии разнообразны. Во многом это обусловлено широтой материала, который можно анализировать (практически все, из чего можно выделить более-менее качественную ДНК может стать объектом исследования), а также подобранных праймеров. Основные области применения ПЦР:

клиническая медицина

- диагностика инфекционных заболеваний
- диагностика наследственных заболеваний
- выявление мутаций
- генотипирование
- клеточные технологии
- создание генетических паспортов

экология

- мониторинг состояния окружающей среды
- анализ продуктов питания
- анализ генетически-модифицированных организмов (ГМО)

судебная медицина и криминалистика

- идентификация личности
- установление отцовства

фармакология

ветеринария

научные исследования (молекулярная биология, генетика)

1.8. Классическое секвенирование. Секвенирование нового поколения.

Секвенирование ДНК - определение последовательности четырех химических структурных блоков - так называемых «азотистых оснований» - которые составляют молекулу ДНК.

Процесс, используемый для секвенирования ДНК, известен как метод обрыва цепи или метод Сэнгера. Он основан на модифицированной форме полимеразной цепной реакции.

Метод обрыва цепи (секвенирование по Сэнгеру).

Наряду с нуклеотидами и полимеразой, используемой в стандартном процессе ПЦР, подготовленная для реакции обрыва цепи среда содержит кроме четырех обычных нуклеотидов ДНК также и варианты каждого из них, так называемые дидезоксинуклеотиды.

Эти дидезоксинуклеотиды похожи на правильные нуклеотиды ДНК, но не содержат 3'-гидроксильной группы.

После того как дидезоксинуклеотид присоединен к растущей цепочке ДНК, ДНК-полимераза не может добавлять никаких других нуклеотидов. Таким образом, процесс репликации прекращается и полученный фрагмент ДНК прерывается.

Репликационная среда содержит только небольшое количество дидезоксинуклеотидных вариантов каждого из четырех нуклеотидов ДНК.

Во время прохождения полимеразной цепной реакции существует высокая вероятность того, что фермент полимеразы добавит немодифицированный нуклеотид к растущей цепи и что процесс репликации будет продолжаться. Но иногда полимеразы связывает дидезоксинуклеотид с цепью и реакция прекращается.

В суспензии, содержащей миллиарды фрагментов ДНК, конечным результатом является серия фрагментов, заканчивающихся одним из четырех дидезоксинуклеотидов.

Все вместе эти фрагменты представляют собой все возможные расположения нуклеотидов А, С, G и Т на синтезируемой нити.

Каждый из четырех вариантов дидезоксинуклеотида возможно пометить разными маркерами (например, красителем, который испускает свет с определенной длиной волны в ультрафиолетовом свете) для того, чтобы сделать различные нуклеотиды легко идентифицируемыми.

Поскольку фрагменты разделяются по длине и массе во время гель-электрофореза, маркеры указывают каким нуклеотидом заканчивается каждый фрагмент. Затем гель можно считывать снизу вверх для идентификации нуклеотидной последовательности.

Этот этап обычно включает в себя использование автоматического секвенатора ДНК, который ускоряет процесс считывания.

Метод секвенирования по Сэнгеру может быть использован для того, чтобы определить за одну реакцию последовательность ДНК образца, содержащего до одной тысячи пар оснований.

Секвенирование большого генома включает в себя следующие три основных этапа:

1. Картирование генома.

Весь геном сначала случайно разбивается на более мелкие последовательности ДНК - приблизительно от 100000 до 300000 пар оснований.

Эти участки затем клонируют в бактериальном векторе, называемом бактериальной искусственной хромосомой или ВАС.

Повторяя этот цикл несколько раз, исследователи получают серию перекрывающихся ВАС.

Затем эти ВАС пропускают через гель-электрофорез, чтобы определить их индивидуальные фингерпринты ДНК. Изучив структуру этих паттернов, исследователи могут определить исходный порядок ВАС в геноме.

2. Секвенирование ДНК.

После того как исходный порядок ВАС был картирован, каждый ВАС разбивается рестрикционными эндонуклеазами на гораздо более мелкие фрагменты, которые могут быть секвенированы с использованием реакции обрыва цепи.

Этот этап секвенирования иногда называют ВАС-ВАС секвенирование.

3. Анализ результатов.

Паттерн перекрывающихся последовательностей ДНК используется для определения порядка фрагментов в каждом ВАС.

В этой процедуре используется несколько различных компьютерных программ, которые могут анализировать последовательности ДНК.

Секвенирование целого генома (метод дробовика, шотган-секвенирование, shotgun sequencing).

Этот метод полностью пропускает стадию картирования генома.

Вместо этого весь геном разбивается на случайные фрагменты сначала около 2000, а затем около 1000 пар оснований. Наличие фрагментов различной длины помогает сделать сборку нуклеотидных последовательностей более точной.

Эти фрагменты, которые насчитывают миллионы, затем секвенируются и анализируются, после чего определяются нуклеотидные последовательности, соответствующие каждой из хромосомам.

Все это делается с помощью мощных компьютеров и сложных программ.

Стремительное развитие молекулярно-биологических технологий предъявляет новые требования к качеству медицинской диагностики в современном мире. В начале XXI века стало возможным применение методов массивного параллельного секвенирования, т.е. определения нуклеотидного состава молекулы ДНК. Это углубило представление о составе и функционировании генома живых организмов (в первую очередь человека и многих видов вирусов и бактерий) и дало мощную базу для применения методов секвенирования в практической медицине. Секвенирование нового поколения (англ. Next-generation sequencing, NGS) явилось предпосылкой к возникновению нового научно-практического направления - молекулярной медицины, в которой проблемы диагностики, профилактики и лечения решаются на молекулярном уровне при помощи анализа нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) и продуктов их экспрессии (белков). Методологическую основу молекулярной медицины составляют современные представления о структуре генома в целом и отдельных генов, их функциональных взаимодействиях, обеспечивающих различные состояния организма в норме и при патологии.

В настоящее время для идентификации клинически значимых мутаций в геноме пациента используется широкий спектр молекулярно-биологических методов. К наиболее распространенным методам детекции генетических нарушений можно отнести аллель-специфичную ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, гибридизацию с использованием ДНК-чипов и секвенирование ДНК.

Однако наиболее комплексным подходом, обеспечивающим достоверный результат подобных исследований, является прямое определение нуклеотидной последовательности интересующих участков генома пациента, которое достигается секвенированием ДНК. Появление технологий массивного параллельного секвенирования позволило не только увеличить производительность и скорость прочтения до миллиардов пар оснований, но и существенно снизить стоимость анализа.

В отличие от применяемых в настоящее время методов молекулярно-генетического анализа (ИФА, ПЦР, капиллярное секвенирование), технология секвенирования системы MiSeq обладает рядом особенностей, способных получить полную картину состояния генома пациента. Среди таких преимуществ можно выделить:

- *Высокую производительность.*

На сегодняшний день секвенатор MiSeq является наиболее мощным настольным секвенатором в мире с производительностью более 15 млрд пар оснований за один запуск, с максимальной длиной прочтения более 600 пар нуклеотидов. Такая производительность позволяет применять прибор с максимальной эффективностью и открывает новые направления для использования прибора в диагностике и исследованиях.

- *Точность анализа.*

Точность получаемых данных 99,99% позволяет быть уверенным в полученном результате, избежать явления ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что является важнейшим фактором при постановке диагноза.

- *Универсальность.*

Секвенатор MiSeq открывает доступ к таким мощным методам секвенирования нового поколения, как секвенирование ампликонов, секвенирование малых геномов (микроорганизмы, вирусы), целевое секвенирование генома, анализ экзонов, секвенирование РНК, анализ статуса метилирования ДНК и многое другое. Это позволяет секвенатору MiSeq решать не только фундаментальные научно-исследовательские, но и прикладные задачи медицинской генетики.

- *Возможность мультиплексного анализа.*

Возможность анализа до 96 образцов за один запуск прибора делает MiSeq незаменимым при скрининговых исследованиях большого числа пациентов. При этом значительно экономится время исследования: для исследования 96 образцов потребуется не более 48 ч.

- *Высокую степень автоматизации процесса исследования и обработки результатов.*

Полный рабочий процесс характеризуется простотой: ручная работа максимально упрощена и ее длительность сведена к минимуму (от 1,5 ч). Поэтому возможность ошибки на стадии подготовки библиотек ДНК значительно снижена. Секвенирование и обработка данных происходят в

автоматическом режиме, без непосредственного участия человека, что исключает «человеческий фактор» и позволяет избежать ошибки, цена которой при неправильной диагностике измеряется зачастую жизнями конкретных людей. Система MiSeq прекрасно подходит для использования в диагностических лабораториях медицинских учреждений из-за простоты обучения персонала работе с прибором.

Высокая точность получаемых результатов позволила использовать секвенатор MiSeq для проведения медицинских исследований и генетической диагностики. Следует отметить, что секвенатор MiSeq (модель MiSeqDx) стал первым в мире секвенатором нового поколения, получившим марку CEIVD и одобрение FDA (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США). Это означает, что MiSeq может использоваться в целях клинической генетической диагностики в странах Европейского союза и США.

Таким образом, проверенная технология секвенирования путем синтеза в сочетании с простой и удобной пробоподготовкой делает секвенатор MiSeq идеальным инструментом для осуществления быстрого и эффективного генетического анализа для широкого круга областей применения: фармакогенетические исследования, диагностика генетических заболеваний и предрасположенности, дифференциальная диагностика рака, полногеномный анализ инфекционных возбудителей, метагеномов и т.п.

Глубина секвенирования, т.е. среднее количество прочтений каждого нуклеотида в геноме, является одним из наиболее важных факторов при секвенировании генома пациента или отдельных генов. При этом мировые стандарты генетических исследований требуют, чтобы каждый нуклеотид был прочитан минимум 30 раз для достоверного определения мутации в геноме пациента.

Основные направления практического использования:

1. Диагностика онкологических заболеваний.

Благодаря применению новых методов и диагностических возможностей в области генетики онкологических заболеваний было установлено, что каждая опухоль обладает собственными, присущими только ей характеристиками, которые отличаются от клеток здоровых тканей. Раковые опухоли даже одной локализации гетерогенны и по-разному реагируют на лекарственную терапию. На основании этих различий стала возможной разработка лекарственных препаратов, действующих непосредственно на молекулярную мишень в опухолевой клетке, не повреждая серьезным образом другие органы и ткани пациента. Особенность такой целевой («таргетной») терапии заключается в том, что каждый конкретный препарат эффективен лишь в отношении опухолей, обладающих определенными молекулярными характеристиками. Применение новых препаратов, ориентированных на «точечное» воздействие на молекулярные механизмы, требует обязательной идентификации

генетических нарушений. Без проведения подобного исследования исход терапии в значительной степени неэффективен.

Подход к диагностике онкологических состояний заключается в точной идентификации маркеров ранней детекции для популяций и отдельных групп риска, наряду с идентификацией маркеров развития и прогнозирования заболевания с целью назначения и оценки эффективности проводимой терапии. Благодаря использованию набора TruSight Cancer стало возможным благополучное решение вопросов предрасположенности и их профилактики к онкологическим заболеваниям. Использование данного набора позволяет секвенировать 94 онкогена и выявить их мутации, которые отвечают за предрасположенность к развитию различных типов рака.

Кроме того, секвенирование ДНК из клеток раковых опухолей позволит идентифицировать мутации в опухоли и определить эффективность терапии. Наборы TruSight Tumor и TruSeq Amplicon - Cancer Panel позволяют секвенировать гены раковых опухолей (включая солидные опухоли легких, толстого кишечника, желудка, яичника, меланомы). Данные диагностические наборы позволяют анализировать до 48 известных онкогенов, включая *ABL1*, *BRAF*, *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3C*, *JAK2* и др. Из отличительных особенностей данных наборов необходимо отметить возможность работы с различными типами образцов (включая парафиновые блоки), а также высокую чувствительность - наборы позволяют точно идентифицировать мутации в малых субпопуляциях раковых клеток в образце (менее 5%).

Таким образом, результаты секвенирования ДНК пациентов позволят выявить мутации в геноме и определить эффективность терапии. Пациенты, являющиеся носителями мутаций в онкогенах, должны проходить тщательный скрининг для раннего обнаружения раковых опухолей. Своевременное выявление мутаций с последующим диспансерным наблюдением позволит: прогнозировать развитие рака, выбрать индивидуальную стратегию лечения, проводить профилактику повторного заболевания и в конечном итоге избежать тяжелых последствий для пациента.

Специфические профили метилирования ассоциированы с факторами, которые позволяют прогнозировать развитие рака. Кроме того, многочисленные исследования показали, что повышение уровня метилирования генов-супрессоров опухолевого роста в раковых тканях в сопоставлении с нераковыми иногда достигает 100%.

2. Диагностика генетических заболеваний.

Следует отметить, что по данным ВОЗ врожденные наследственные заболевания составляют значительную долю наследственной патологии. Многие генетические заболевания, несмотря на достаточно высокий уровень медико-биологических знаний, представляют значительные трудности в своевременной диагностике и эффективном лечении и часто приводят к значительному нарушению качества жизни больных, инвалидизации и раннему летальному исходу.

Использование набора TruSight Exome позволяет секвенировать за один запуск прибора ~ 2700 генов и выявлять мутации, лежащие в основе или ассоциированные с множеством наследственных заболеваний, которые описаны в международной базе данных Human Gene Mutation Database (HGMD). Кроме того, данную тест-систему возможно использовать для диагностики переносимости лекарственных препаратов, что позволит обосновать применение того или иного препарата, а также оценить его эффективность.

Отдельно стоит отметить возможность применения секвенатора для диагностики кардиомиопатий. Диагностический набор реагентов TruSight Cardiomyopathy позволяет секвенировать 46 генов, которые связаны с развитием различных типов кардиомиопатий: гипертрофической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, рестриктивной кардиомиопатии, аритмогенной правожелудочковой кардиомиопатии, катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии, синдромом некомпактного миокарда левого желудочка. Точная своевременная дифференциальная диагностика наследственных типов кардиомиопатий позволит назначить планомерное лечение с целью предотвращения и смягчения тяжелых последствий для пациента.

В настоящее время существует проблема диагностики аутизма у детей: во многих случаях специалисты могут расцениватьстораживающие особенности раннего развития как признаки других нарушений самого широкого спектра, например, как проявление ДЦП, сенсорных или речевых нарушений, невропатии и т.д. К сожалению, коррекционная работа редко начинается до 3-летнего возраста, потому что, как правило, аутизм редко диагностируется до 3 лет. Это приводит к потере времени и уменьшает шансы выравнивания ребенка (общение, восприятие, моторика, интеллектуальное развитие, речь, игра, навыки социального поведения). Хотя точные причины аутизма неизвестны, факторы риска включают в себя генетический компонент. Секвенатор в сочетании с использованием набора TruSight Autism позволяет секвенировать 101 ген и выявить нарушения, которые ассоциированы с расстройствами аутистического спектра. Такой подход позволит осуществить раннюю диагностику аутизма у детей и своевременно начать поведенческую терапию, что позволит улучшить обучение, коммуникацию и социальные навыки ребенка.

3. Диагностика инфекционных заболеваний.

В настоящее время секвенатор успешно применяется в диагностике инфекционных заболеваний. Технология секвенирования позволяет идентифицировать микроорганизмы в анализируемом образце путем секвенирования 16S рРНК бактерий. Данная методика позволяет производить метагеномный анализ, т.е. расшифровку «суммарного» генома бактериологических сообществ, что может дать ясную картину микробной нагрузки при анализе вспышек внутрибольничных инфекций и детекции

септических состояний. Результаты такого анализа позволят подобрать соответствующую терапию при лечении пациентов. Высочайшая производительность при возможности параллельного мультиплексного исследования 96 геномов позволит в кратчайшие сроки выявить возбудителя, включая некультивируемые штаммы, с очень высокой чувствительностью (до 0,1% устойчивого штамма). Помимо точной идентификации возбудителей, глубокое секвенирование позволит проводить активный эпидемиологический надзор за динамикой развития и распространения лекарственной устойчивости.

4. HLA-типирование.

Отдельно стоит отметить возможность применения секвенатора для HLA-типирования. В отличие от применяемых в настоящее время методов тканевого типирования (ИФА, ПЦР, серологические методы) технология секвенирования нового поколения обладает рядом особенностей и преимуществ: быстрое получение результата типирования, анализ любых необходимых локусов МНС, отсутствие этапов работы с диагностическими сыворотками, высокое покрытие генов при секвенировании. Высокоточные результаты анализа локусов HLA позволяют подобрать донора, совместимого с пациентом по HLA-антигенам, при проведении трансплантации органов, тканей и гемопоэтических стволовых клеток при синдромах костномозговой недостаточности, иммунодефицитах, гемобластозах, онкологических и наследственных заболеваниях, а также диагностировать иммунные формы невынашивания беременности. Кроме того, возможен мультиплексный анализ специфических участков, ассоциированных с некоторыми аутоиммунными заболеваниями, такими как рассеянный склероз, нарколепсия, глютеновая болезнь, ревматоидный артрит и др. В настоящее время HLA-типирование с использованием технологии секвенирования NGS успешно применяется в крупных медицинских центрах и лабораториях США и стран Европейского Союза: в частности, в Техническом университете г. Кайзерслаутерн (Германия), медицинском центре DKMS Life Science Lab (Германия), компания «HistoGenetics» (США) использует секвенатор MiSeq с целью создания банков доноров костного мозга.

Таким образом, учитывая возможность проведения нескольких разнотиповых анализов, способность проводить быстрое автоматическое секвенирование большого количества образцов, точности проведения генетического анализа, возможности автоматической интерпретации результатов анализа, метод секвенирования является оптимальным решением для клиничко-диагностических лабораторий. Применение технологий секвенирования нового поколения способно дать мощнейший толчок для развития медицинской области в РБ и выйти на новый этап развития медицины, превентивной диагностики, тем самым способствуя улучшению качества жизни и здоровья населения.

1.9. Прикладная биохимия в судебной практике.

Предметом медико-криминалистической экспертизы является установление и оценка фактов (признаков), для выявления которых требуется помимо специальных познаний в области судебной медицины применение различных лабораторных методов исследования (физических, технических, химических, математических и др.).

Экспертизы и исследования

- Основные (по направлению СК);
- дополнительные или повторные;
- комплексные;
- комиссионные.

Экспертиза физического лица

Предметом судебно-медицинской экспертизы физического лица является медицинское обследование физического лица с целью установления характера и тяжести телесного повреждения, половых состояний и разрешения других вопросов, требующих познаний в области судебной медицины.

Объект:

- живые лица, медицинские документы (истории болезни, индивидуальные карты амбулаторного больного, рентгеновские снимки и т.д.), материалы дела.

Задачи:

- установление характера повреждений с медицинской точки зрения (ссадина, кровоподтек, рана, перелом кости и т. п.), их локализации и свойств;
- установление вида орудия или средства, которыми могли быть причинены повреждения;
- установление механизма возникновения повреждений;
- установление давности (срока) причинения повреждения;
- установление степени тяжести телесных повреждений с указанием квалифицирующего признака – опасность для жизни, расстройство здоровья, стойкая утрата трудоспособности и т.д.;
- разрешение иных вопросов, указанных в постановлении (определении) и не выходящих за пределы специальных познаний эксперта.

Экспертиза трупов

Предметом судебно-медицинской экспертизы трупа является исследование объектов с целью решения медико-биологических вопросов, возникающих в ходе дознания, предварительного следствия и судебного разбирательства.

Задачи:

- идентификация трупа либо его останков;
- установление причины смерти в случаях насильственной смерти, кончины от болезни, обусловленной причинением каких-либо повреждений;
- диагностика и реконструкция события и его параметров (установление механизма нанесения телесного повреждения; определение возможности

получения конкретных травм при падении и пр.; установление дистанции выстрела, последовательности причинения повреждений и т. д.);

- установление времени события (определение давности наступления смерти, давности образования телесного повреждения);

- установление причин и условий события, причинных связей между событиями;

- разрешения иных вопросов, указанных в постановлении (определении) и не выходящих за пределы специальных познаний эксперта

Медико-криминалистическая экспертиза

Предметом медико-криминалистической экспертизы является установление и оценка фактов (признаков), для выявления которых требуется помимо специальных познаний в области судебной медицины применение различных лабораторных методов исследования (физических, технических, химических, математических и др.).

Объекты - органы и ткани трупа, живые лица, орудия травмы, одежда и обувь, иные объекты со следами, позволяющими установить механизм образования повреждений на теле человека, материалы следственных и судебных дел.

Задачи:

- Диагностические задачи – реконструкционные (наличие следов, механизм и давность их образования).

- Классификационные задачи – отнесение представленных объектов к определенному общепринятому классу.

- Ситуалогические задачи – комплексное изучение следов и механизма их образования, направленное на реконструкцию события.

Виды медико-криминалистических экспертиз:

1. Установление характера повреждений и механизма их образования на теле и одежде при действии тупых и острых предметов, огнестрельного оружия, электрического тока и пр.

Объекты: кожные лоскуты, костные препараты, одежда, орудия травмы, предметы, изъятые с места происшествя, орудия, фототаблицы осмотра места происшествя.

Задачи экспертизы при исследовании повреждений, образованных острыми орудиями:

- установление механизма образования повреждений;

- установление видовых, групповых и индивидуальных признаков колющих, режущих, колюще-режущих и рубящих орудий;

- экспертиза повреждений, причиненных пилами, ножницами, осколками стекла.

Задачи экспертизы при исследовании повреждений, образованных тупыми орудиями (в т.ч. при транспортной травме и падении с высоты):

- установление механизма образования повреждений;

- установление видовых, групповых и индивидуальных признаков травмирующих орудий;
- установление места приложения и направления действия травмирующей силы.

Задачи экспертизы при исследовании огнестрельных повреждений:

- установление факта поражения снарядом огнестрельного оружия тела и одежды;
- установление количества повреждений на теле и одежде и последовательности выстрелов;
- установление локализации входного и выходного огнестрельных повреждений, направления раневого канала;
- установление дистанции выстрела;
- установление вида и особенностей огнестрельного оружия и боеприпасов;
- установление факта причинения повреждений при выстреле через преграду и после рикошета;
- определение условий возникновения повреждений тела и одежды при взрывной травме и характеристики взрывных устройств.

2. Установление формы и механизма образования следов крови на одежде, орудиях травмы и других объектах.

Объекты: следы крови.

Задачи экспертизы по установлению обстоятельств происшествия по следам крови:

- установление характера следов крови (являются ли они брызгами, каплями, помарками, потеками, следами волочения и др.);
- установление механизма образования данных следов (например, образовались ли данные брызги в результате взмахов окровавленным предметом или при ударах по поверхности, покрытой жидкой кровью; установление высоты падения капель крови; при исследовании лужи крови на месте происшествия – установление количества излившейся крови; по помаркам крови – направление движения окровавленного предмета);
- установление положения потерпевшего после получения им ранения и начала наружного кровотечения и его возможных последующих перемещениях;
- установление взаимоположения потерпевшего и нападавшего в момент их действий, вызывающих образование следов крови на них и на окружающей обстановке;
- установление конкретного места, где наносились удары.

3. Исследование костных останков для установления видовой, половой и возрастной принадлежности, роста, отождествления личности человека, а также давности захоронения.

Объекты: костные останки.

Задачи экспертизы при исследовании костных останков:

- установление количества трупов, которым принадлежали костные останки;
- установление видовой, расовой, половой принадлежности костных останков;
- установление возраста, роста, давности захоронения человека, чьи останки представлены на исследование;
- установление механизма образования повреждений на скелетированном трупе;
- установление на скелетированном трупе следов перенесенных заболеваний, травм, хирургических операций.

4. Определение возраста рентгенологическим и антропометрическим методами.

Объекты: физическое лицо, рентгенограммы

Задачи экспертизы по определению возраста и идентификации личности:

- установление возраста по признакам внешности (возрастных изменений – морщин на лице, состояния зубов);
- установление возраста по рентгеновским снимкам костей скелета;
- установление личности по признакам внешности с использованием данных о наличии и давности рубцов кожи, наличии пластических операций и т.д.;
- установление принадлежности представленного рентгеновского снимка конкретному человеку.

5. Другие виды экспертиз, для производства которых необходимы специальные познания в области судебной медицины и пограничных дисциплин (антропология, криминалистика и др.).

Объекты: кожные лоскуты, зубные протезы, материалы дела.

Задачи экспертизы при исследовании следов зубов человека:

- установление на кожных покровах тела потерпевшего следов воздействия зубов человека;
- установление индивидуальных особенностей данных зубов;
- установление механизма образования переломов зубных протезов, коронок и т.п., образовались ли они в результате удара или сдавления.

6. Реконструкция событий (ситуационная экспертиза).

Объекты: физические лица.

Задачи экспертизы реконструкции событий (ситуационная экспертиза):

- определение соответствия показаний участников событий о динамике процессов получения повреждений (на теле, одежде и окружающих предметах) объективным данным, добытым следственным и экспертным путем;
- установление возможности образования повреждений (следов) на теле и одежде при конкретных обстоятельствах и условиях.

Судебно-биологическая экспертиза

Предметом судебно-биологической экспертизы является исследование следов биологического происхождения, образованных кровью, спермой, потом,

слюной, клетками эпителия, вагинальными выделениями, мочой, в целях определения механизма (условий) образования следов и установления видовой и групповой их принадлежности.

Объекты: следы биологического происхождения, образованные кровью, спермой, потом, слюной, клетками эпителия, вагинальными выделениями, мочой. К ним относятся также волосы, органы и ткани человеческого организма, кости и их фрагменты. Источником следов биологического происхождения является тело человека, его органы.

От правильности и своевременности проведения осмотра места происшествия, поиска, фиксации и изъятия объектов биологического происхождения зависит их пригодность для дальнейшего исследования и возможность использования для решения идентификационных задач.

Задачи:

- Идентификационные задачи – установление групповой и видовой принадлежности следов биологического происхождения.
- Диагностические задачи – реконструкционные (наличие следов, механизм и давность их образования).
- Классификационные задачи – отнесение представленных объектов к определенному общепринятому классу.

Генетическая экспертиза

Предметом генетической экспертизы являются фактические данные (факты) об индивидуально-конкретном тождестве человека или биологической общности происхождения (биологическом родстве), устанавливаемые на основе специальных биологических и криминалистических познаний.

Объекты: ДНК, полученная из различных органов и тканей, а также выделений человека — клеток крови, мышечной ткани, костей, слюны (при условии наличия в ней клеток слизистой полости рта или клеток крови), волос (при условии наличия в них волосяной луковицы с влагалищными оболочками).

Задачи:

- установление индивидуально-конкретного тождества биологических следов и объектов;
- установление биологического родства (отцовства, материнства и др.) и диагностика генетического пола человека с помощью исследования объектов биологического происхождения методом генотипоскопии;
- установление генотипа неизвестных биологических объектов.

Генетические экспертизы проводят, как правило, после судебно-биологических экспертиз.

Генетические экспертизы могут проводиться без предварительных судебно-биологических экспертиз в случаях:

- исследования объектов малого размера (подногтевое содержимое, окурки, мелкие соскобы, смывы, презервативы и т.д.);
- исследования костной и мышечной ткани, парафиновых блоков, гистологических препаратов;

- исследования отдельных следов рук на объектах экспертизы;
- исследования предметов одежды, предметов личной гигиены и т.д. с целью установления генотипа лица, пользовавшегося указанными предметами.

Гистологическая экспертиза

Предметом судебно-гистологической экспертизы является изучение особенностей повреждений органов и тканей на микроскопическом уровне с применением специальных методов и методик исследования с изготовлением гистологических препаратов.

Объекты: послеоперационный и биопсийный материал от живых лиц; внутренние органы трупа; кровь из левого желудочка сердца; вода из водоемов; медицинские документы.

Задачи:

- установление наличия и оценка патологических изменений в органах и тканях, обусловленных насильственными воздействиями или заболеваниями;
- определение прижизненности и давности повреждений;
- выявление диатомового планктона в органах, в крови из левого желудочка сердца, воде из водоемов (при утоплении).

Химическая экспертиза

Предметом судебно-химической экспертизы является идентификация и количественное определение токсикологически важных веществ для установления причины смерти.

Объекты: биологические жидкости (кровь, моча), внутренние органы трупа, рвотные массы, промывные воды, смывы с рук и ротовой полости и иные объекты небиологического характера, изъятые с места происшествия при обнаружении трупа, которые могли явиться причиной смерти или отравления.

Задачи:

- идентификация и количественное определение важных с токсикологической точки зрения веществ для установления причины смерти;
- идентификация и количественное определение выделенных из биологического материала лекарственных, наркотических, психотропных и других веществ, которые могут повлиять на психическое и (или) физическое состояние человека;
- идентификация и количественное определение важных с токсикологической точки зрения веществ в объектах небиологического происхождения, имеющих значение для судебно-медицинской и судебно-следственной практики, изъятых с места происшествия при обнаружении трупа, предположительно принятых (введенных) внутрь и являющихся причиной смерти (неизвестные жидкости, медикаменты, содержимое шприцев и т.п.);
- определение повышенного содержания отдельных металлов в органах, тканях, жидкостях и выделениях человека;
- проведение экспертных исследований, связанных с применением различных видов спектрального анализа, для установления отложений металлов в зоне повреждения на теле потерпевшего.

В случаях эксгумации на судебно-химическую экспертизу также доставляют фрагменты одежды, обивки, подстилки, часть нижней доски гроба, окружающую землю.

Общая схема проведения молекулярно-генетической экспертизы

Как правило, генетическая экспертиза начинается в момент осмотра места происшествия. Криминалисты определяют объекты, на которых могли остаться биологические следы. Мы ищем ДНК, а значит, следы должны содержать клетки. Причем, несмотря на то, что ДНК содержится в ядрах, безъядерные клетки эпителия кожи тоже подходят для этих целей. Даже когда ядро клетки распадается и перестает существовать как отдельная структура, ДНК в таком материале все равно сохраняется, хотя и в деградированном виде. Поскольку для криминалистической экспертизы зачастую требуются небольшие фрагменты ДНК, то установить генотип получается даже из такого разрушенного материала. Затем маленький кусочек объекта отделяют или делают с его поверхности смыв — тем самым начинают подготовку образца ДНК. Также могут получить образец крови или мазок эпителия с внутренней поверхности щеки у живого человека. Далее клетки образца разрушают специальными ферментами, что позволяет освободить ДНК из ядра. Затем, используя специализированные наборы с ферментами, исследуемые участки ДНК амплифицируют (размножают) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для проведения такой реакции применяют олигонуклеотидные праймеры и термостабильные ДНК-полимеразы. После этого полученный образец с размноженными анализируемыми участками ДНК исследуют, используя гель-электрофорез или капиллярный электрофорез, который проводится в специальных генетических анализаторах.

Современная генетическая экспертиза подкреплена хорошей научной и статистической базой:

- частота встречаемости маркеров в различных популяциях хорошо изучена;
- они наследуются независимо (признаки не сцеплены);
- большинство маркеров имеют десятки вариантов;
- они неизменны в течение всей жизни и определяются десятилетиями после смерти.

Современные технологические возможности позволяют обнаружить ДНК-след на окурках сигарет, очках, расческах, перчатках и на любых иных предметах, которые взаимодействовали с телом человека. Так генетическая экспертиза устанавливает не только личность, но отчасти реконструирует ее действия и образ жизни.

Такая особенность молекулярно-генетической экспертизы привела к неожиданным последствиям. Например, некоторые методы исследований, которые не показывают столь впечатляющей достоверности, стали пользоваться меньшим доверием и частично ушли в тень. В первую очередь это касается судебной серологии, габитоскопии (отрасли, которая занимается

распознаванием человека по признакам внешности) и одного из разделов судебной антропологии — прижизненной видеозаписи (или, говоря научным языком, краниофациальной идентификации). В результате следствие и правосудие стали пересматривать критерии, предъявляемые к результатам экспертно-криминалистических исследований. Всё это, в совокупности с возрастающими возможностями генетической экспертизы, привело к кризису в самой судебной генетике. В мировой практике стали всплывать случаи неправильной трактовки результатов экспертиз, что заставляет по новому осмыслить происходящее. В чем же причина кризиса судебной генетики?

Всё дело в сверхвысокой чувствительности современной генетической экспертизы. Практически на любом объекте можно обнаружить следы генотипа людей, входивших с ним в контакт. Этот феномен назвали переносом ДНК-содержащего материала. Теоретически, ваша ДНК через рукопожатие с другим человеком может «перекочевать» на рукоятку ножа, которым впоследствии будет совершено преступление. Прежде, чем делать окончательные выводы и выносить обвинительный вердикт, необходимо надежно интерпретировать все обнаруженные улики и доказательства.

Судебная биохимическая экспертиза

Предмет: Судебная биохимическая экспертиза на параметры (холинэстераза, гликоген, гликозилированный гемоглобин, глюкоза, мочевины, креатинин, общий белок, альбумин, миоглобин, мочевины, калий и натрий в миокарде).

Объекты: биологические жидкости, ткани и внутренние органы трупа.

Задачи: установление биохимических параметров в исследуемых объектах, свидетельствующих о наличии заболеваний, являющихся причиной смерти или способствующих наступлению смерти.

Основным отличием судебно-биохимических исследований от клинических лабораторных является отсутствие возможности повторного исследования в связи с трудностями повторного изъятия биоматериала у умершего и ограниченным сроком исследования и хранения биологических объектов в биохимических отделениях бюро судмедэкспертизы.

Комплекс судебно-биохимических исследований позволяет провести посмертную диагностику переохлаждения, внезапной и/или скоропостижной смерти, сахарного диабета и состояния диабетической комы, указать на наличие почечно-печеночной недостаточности, состояние интоксикации различного генеза, механическую асфиксию, краш-синдром, синдром позиционного сдавления, электротравму, отравление фосфорорганическими соединениями, метгемоглобинообразователями.

Скоропостижная и/или внезапная смерть лиц молодого и детского возраста.

Объекты исследования: • кровь из бедр/вены, кровь правого и левого желудочка сердца, перикард/жидкость, моча • печень, скелетная мышца • миокард левого желудочка • (1-7 фрагментов)

Биохимические показатели: • глюкоза • сердечный тропонин-I • миоглобин • мочеви́на • креатинин • гликозилированный гемоглобин • билирубин, уробилиноген • кетоновые тела • гликоген • активность ЛД.

Дифференциальная диагностика внезапной сердечной смерти.

Объекты исследования: • кровь из бедр/вены, кровь правого и левого желудочка сердца перикард/жидкость, моча • Печень, скелетная мышца • Миокард левого желудочка • (1–7 фрагментов).

Биохимические показатели: • глюкоза • миоглобин • сердечный тропонин-I • гликоген • активность ЛД.

Действие холода.

Объекты исследования: • кровь из бедренной вены • печень, миокард, скелетная мышца.

Биохимические показатели: • глюкоза • гликоген.

Почечно-печеночная недостаточность

Объекты исследования: • кровь из бедренной вены • моча

Биохимические показатели: • глюкоза • мочеви́на • креатинин • миоглобин • билирубин • уробилиноген

Отравление неустановленным веществом

Объекты исследования: • кровь из бедренной вены • моча • кровь правого и левого желудочка сердца перикард/жидкость • печень, скелетная мышца • миокард левого желудочка • (1–7 фрагментов).

Биохимические показатели:

• активность холинэстеразы • мочеви́на • креатинин • миоглобин • метгемоглобин • билирубин • уробилиноген • сердечный тропонин-I

Механическая странгуляционная асфиксия.

Объекты исследования: • кровь из бедренной вены • кровь из в/с синуса ТМО • кровь из правого и левого желудочков сердца • подкожно-жировая клетчатка из области странгуляционной борозды • подкожно-жировая клетчатка из симметричной интактной области .

Биохимические показатели: • разница содержания глюкозы в крови • гемин • коэффициент прижизненности повреждения

Электротравма Краш-синдром Ожоговая болезнь Синдром позиционного сдавления.

Объекты исследования: • кровь из бедренной вены • моча • перикардальная жидкость.

Биохимические показатели: • глюкоза • мочеви́на • креатинин • миоглобин • сердечный тропонин-I.

Прижизненность механических повреждений

Объекты исследования: • подкожно-жировая клетчатка из области повреждения • подкожно-жировая клетчатка из области контроля.

Биохимические показатели: • гемин • на каждый объект повреждения свой контрольный объект из симметричной области.

Отравление метгемоглобинообразователями.

Объекты исследования: • кровь из бедренной вены.

Биохимические показатели: • метгемоглобин.

Взрывотехническая экспертиза.

Предметом судебной взрывотехнической экспертизы является выявление закономерностей механизма возникновения взрыва и образования следов его воздействий на объектах, составляющих вещную обстановку места происшествия, а также конструкция, способ изготовления, область применения и степень опасности источника взрыва.

Объект: взрывчатые вещества и пиротехнические составы, взрывные устройства, боеприпасы, место взрыва и обнаруженные на нем повреждённые объекты и другие следы взрыва, а также материалы уголовного производства.

Задачи:

- Ситуационные – восстановление обстановки места взрыва, определение направленности взрыва, восстановление конструкции взрывных устройств.

- Диагностические – установление факта взрыва, его природы и технической причины, определение центра взрыва, установление конструкции отдельных элементов и взорванного устройства в целом, принципа его функционирования, оценка массы взорванного вещества, установление поражающих свойств взрывного устройства, радиуса поражающего (разрушительного) действия взрыва, а также установление наличия или отсутствия у лица - изготовителя взрывного устройства специальных знаний в области боеприпасов, химии и технологии взрывчатых веществ, а также во взрывном деле.

- Классификационные – установление принадлежности исследуемых веществ и изделий к взрывчатым веществам и взрывным устройствам.

Экспертиза наркотических средств, психотропных веществ, их аналогов и прекурсоров.

Предметом экспертизы наркотических средств, психотропных веществ, их аналогов и прекурсоров (далее – НСПВАиП) являются фактические данные, устанавливаемые на основе специальных научных познаний о природе, свойствах, технологии и методах кустарного либо промышленного изготовления наркотиков.

Объекты: НСПВАиП в виде порошкообразных веществ или растворов в различных растворителях; наркосодержащие растения и продукты их переработки; предметы-носители – вещества растительного происхождения, пропитанные НСПВАиП для их употребления путем курения; одежда; посуда и приспособления, используемые при кустарном производстве НСПВАиП; предметы и приспособления для употребления НСПВАиП (шприцы, ложки и др.).

Задачи:

- отнесение исследуемых объектов к числу наркотических средств, психотропных веществ, их аналогов и прекурсоров с указанием их рода;

- обнаружение следов НСПВАиП на различных предметах-носителях (кроме органов и тканей тел людей и животных, а также продуктов жизнедеятельности живых организмов, являющихся объектами медицинской судебно-химической экспертизы).

Экспертиза спиртосодержащих жидкостей.

Предметом экспертизы спиртосодержащих жидкостей является установление основного химического состава спиртосодержащих жидкостей и отнесение их к определенному виду.

Объект: спиртосодержащие жидкости заводского (промышленного) изготовления, спиртосодержащие жидкости домашнего (кустарного) изготовления.

Задачи: установление видовой и групповой принадлежности спиртосодержащих жидкостей.

Особенности:

- Установление пригодности продукции для употребления в пищу, определение наличия в ней веществ (в том числе ядовитых и отравляющих), которые могут причинить вред здоровью человека, является прерогативой специалистов Министерства здравоохранения.

- Установление соответствия спиртосодержащих жидкостей заводского (промышленного) изготовления требованиям технических нормативных правовых актов (ГОСТ, СТБ, ТУ) проводятся в аккредитованных лабораториях Госстандарта, Минздрава и НПЦ по продовольствию НАН Беларуси.

Экспертиза волокнистых материалов

Предметом экспертизы волокнистых материалов и изделий из них являются устанавливаемые фактические данные, свидетельствующие о связи с расследуемым событием происхождения конкретных объектов волокнистой природы или их остатков.

Объекты: текстильные волокна в виде микрочастиц, нитки, пряжа в виде отрезков, ткань, трикотаж, искусственный мех, предметы одежды, предметы быта из тканых и нетканых материалов, крученые и плетеные изделия, сожженные остатки текстильных материалов

Задачи:

- обнаружение частиц текстильных волокон, определение их природы и локализации;

- определение общей родовой (групповой) принадлежности волокон, установление факта контактного взаимодействия, установление вида, группы, подгруппы, целевого назначения и общего источника происхождения ткани, трикотажа, искусственного меха, нетканого материала, крученых и плетеных, ковровых изделий;

- идентификация целого по частям (решается комплексно, чаще всего с привлечением эксперта-трасолога);

- исследование сожженных остатков объектов волокнистой природы.

Экспертиза лакокрасочных материалов.

Предметом экспертизы лакокрасочных материалов и покрытий являются устанавливаемые фактические данные, свидетельствующие о связи с расследуемым событием происшествия конкретных объектов – лакокрасочных материалов и лакокрасочных покрытий.

Объекты: лакокрасочные покрытия и их фрагменты, образцы лакокрасочных материалов и отдельных их компонентов (красители, пигменты, наполнители, растворители, пластификаторы), предметы-носители (одежда, детали машин, инструмент и др.) с наслоениями лакокрасочных материалов и покрытий.

Задачи:

- Идентификационные – установление общей родовой (групповой) принадлежности лакокрасочных материалов и покрытий при наличии образцов сравнения, а также установление принадлежности фрагментов лакокрасочного покрытия лакокрасочному покрытию конкретного объекта.

- Диагностические – установление факта перекраски (подкраски) предмета, механизма образования следов-наслоений лакокрасочных материалов и покрытий, отнесение лакокрасочного покрытия к заводскому (незаводскому).

- Классификационные – обнаружение лакокрасочных материалов и покрытий на объекте-носителе и отнесение их к определенному виду, установление вида дефектов лакокрасочных покрытий, отнесение их к эксплуатационным и производственным.

- Ситуационные – установление факта контактного взаимодействия конкретных окрашенных предметов (решается в рамках комплексной автотехнической и трасологической экспертизы).

Экспертиза полимерных материалов

Предметом экспертизы полимерных материалов и изделий из них являются устанавливаемые фактические данные, свидетельствующие о связи с расследуемым событием происшествия конкретных объектов из пластмасс, резины и изделий из них, клеящих материалов.

Объекты: изделия из пластмассы, резины и пленочных полимерных материалов (упаковочные средства, включая клеящиеся ленты, детали транспортных средств, продукция электротехнической и кабельной промышленности, изоляционные ленты, изделия обувной и галантерейной промышленности, автомобильные шины и др. резинотехнические изделия, поролон, пенопласт, монтажная пена и др.), их фрагменты, наслоения полимерных материалов (пластмасс, резин, клеев) на различных предметах-носителях, клеи и клеевые композиции, их следы-наслоения, видоизмененные части полимерных материалов и изделий из них.

Задачи:

- Идентификационные – установление общей родовой (групповой) принадлежности полимерных материалов при наличии образцов сравнения; отождествление искомого объекта по следам или частям целого.

- Классификационные – обнаружение частиц полимерных материалов (резины, клея) на объекте-носителе и установление их принадлежности к определенному виду изделий, отнесение исследуемого объекта к определенному множеству (классификационной группе).

- Диагностические – обнаружение наслоений, притертостей, фрагментов полимеров на предмете-носителе и на месте происшествия, определение причин изменения свойств объектов полимерной природы, механизма следообразования.

- Реконструктивные – установление первоначального вида материала объекта (типа полимера), измененного в результате термического, химического или др. воздействия при наличии образцов сравнения с известными характеристиками.

Экспертиза специальных химических веществ

Предметом экспертизы специальных химических веществ являются устанавливаемые фактические данные, свидетельствующие о связи с расследуемым событием происшествия конкретных объектов специальных химических веществ.

Объекты: различные предметы-носители, в том числе волосы, смывы с рук, одежда, а также непосредственно красящие (люминесцирующие) вещества.

Задачи:

- установление факта наличия на представленном объекте-носителе специальных химических веществ;

- установление однородности химического состава красящего (люминесцирующего) вещества, обнаруженного на объектах, изъятых при осмотре места происшествия, с представленными образцами сравнения.

Экспертиза нефтепродуктов и горюче-смазочных материалов

Предметом экспертизы нефтепродуктов и горюче-смазочных материалов (НП и ГСМ) являются устанавливаемые фактические данные, свидетельствующие о связи с расследуемым событием происшествия конкретных объектов нефтехимической природы.

Объекты: легковоспламеняющиеся нефтепродукты (ЛВНП) исследуются в основном по делам, связанным с поджогами, сожжениями трупов и так далее, а также по делам о фальсификации, хищении НП; смазочные материалы (СМ) наиболее часто исследуются по делам о дорожно-транспортных происшествиях, а также связанным с применением холодного и огнестрельного оружия; твердые нефтепродукты (ТН) исследуются по разнообразным уголовным делам, связанным с убийствами, кражами, дорожно-транспортными происшествиями.

Задачи:

- обнаружение следов нефтепродуктов и других легковоспламеняющихся и горючих жидкостей (ЛВЖ и ГЖ) на поверхности либо в массе предметов-носителей; установление их вида и марки;

- проведение сравнительных исследований ЛВЖ и ГЖ (в том числе НП) методом газожидкостной хроматографии (сравнение качественного и количественного состава), выявление индивидуализирующих признаков; установление общей родовой (групповой) принадлежности объектов (отнесение к одному сырьевому источнику, к одной партии выпуска) и принадлежности единой массе;
- определение вида и марки товарных НП;
- определение соответствия товарных автомобильных бензинов ГОСТу, ТУ (октановое число, давление насыщенных паров, фракционный состав);
- обнаружение, идентификация и количественное определение примесей, не характерных для состава товарных НП;
- обнаружение, идентификация и количественное определение присадок, вводимых в состав бензинов для придания им определенных свойств (повышение октанового числа, улучшение антиокислительных и противозносных свойств);
- исследование дизельных топлив, содержащих в своем составе биотопливо (метиловые эфиры жирных кислот);
- обнаружение в составе НП красителей, применяемых для маркировки топлив, используемых в сельском хозяйстве;
- определение вязкости и плотности НП;
- определение количественного содержания общей серы в НП;
- определение компонентного состава нефтяных растворителей;
- установление природы автомобильных масел, проведение сравнительного исследования.

1.10. Биосенсорная техника: современное состояние и перспективы.

В последнее десятилетие возникли новые контакты на первый взгляд между очень далекими областями: электроникой и биохимией. Их взаимное проникновение друг в друга создало новую сферу интересов науки - биоэлектронику. Первым шагом в этой области было создание новых устройств для анализа и переработки информации, получивших название биосенсоров. Их появление диктовалось потребностями медицинской практики, биотехнологии и охраны окружающей среды, где чрезвычайно важна роль химических, биологических и иммунологических анализов. Эти анализы должны быть простыми, доступными и недорогими. Для их проведения необходимы инструментальные электронные устройства, обладающие соответствующими характеристиками. Такими устройствами и являются биосенсоры, которые рассматриваются как первое поколение биоэлектронных устройств.

Биосенсоры (Рисунок 23) – это аналитические устройства, использующие биологические материалы (ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены / антитела, липосомы, органеллы, рецепторы, ДНК) для "узнавания"

определенных молекул и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала.

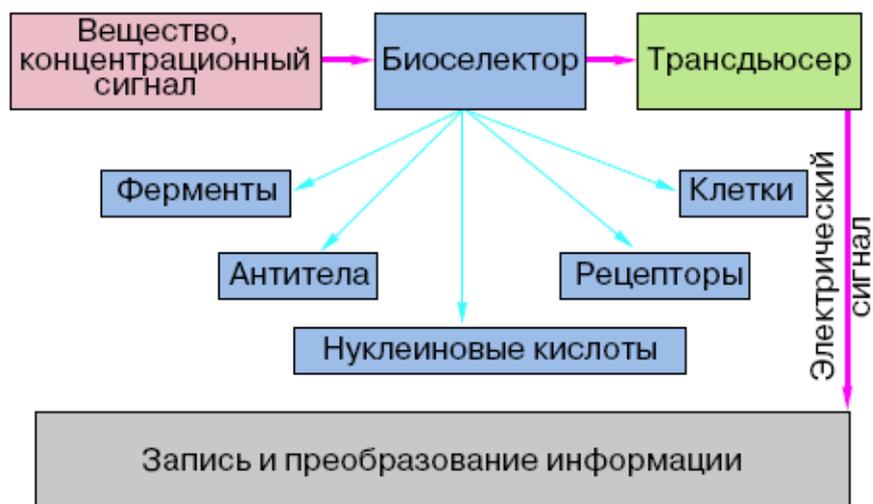


Рисунок 23 - Принципиальная схема биосенсора.

Идея создания такого рода устройств существует уже более 40 лет. Впервые ее высказали, по-видимому, Л. Кларк и К. Лионс в 1967 г. Идея Кларка состояла в использовании ферментного электрода, то есть электрохимического датчика с иммобилизованным на его поверхности ферментом. За прошедшие десятилетия эта идея получила достаточное развитие. Создано и исследовано много систем, некоторые получили апробирование и промышленную реализацию.

Конструктивно биосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей, или трансдьюсеров, - биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом. При взаимодействии биоматериала с аналитическим раствором возникает биохимический сигнал, который превращается в электрический и фиксируется с помощью специальной аппаратуры (например, компьютера). В данном случае реализуется принципиально новый способ получения информации о химическом составе раствора. Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, не прибегая ни к каким дополнительным операциям, связанным с использованием других реагентов, концентрированием и т.д. (отсюда и название - безреагентные методы анализа).

Подбор биологического тестирующего элемента.

Существует большое разнообразие физических трансдьюсеров: электрохимические, спектроскопические, термические, пьезоэлектрические, трансдьюсеры на поверхностных акустических волнах и т.п. Наибольшее распространение получили электрохимические преобразователи. Одни из них генерируют потенциал на специальном электроде, на поверхность которого нанесен слой биоматериала, другие – электрический ток реакции продукта

превращения тестируемого вещества на поверхности электрода (потенцио- и амперометрические биосенсоры). Если физический преобразователь использует изменение светопоглощения в области биослоя, то такой биосенсор называется, например, оптоволоконным, поскольку измеряемый сигнал будет передаваться измерительному прибору по оптическому волокну. Соответствующий физический преобразователь по аналогии с электродом называют оптродом.

Типы чувствительных элементов распознавания (биослой) и физических преобразователей в сенсорах.

Первое упоминание об аналитических устройствах на основе ферментов или ферментсодержащих материалов появилось сравнительно недавно, в 1960-х гг. Затем в обиход вошло понятие "биосенсор" или "биочип". Это важное событие в науке, поскольку функционально биосенсоры сопоставлены с датчиками живого организма – биорецепторами, способными преобразовывать все типы сигналов, поступающих из окружающей среды, в электрические (Рисунок 24).

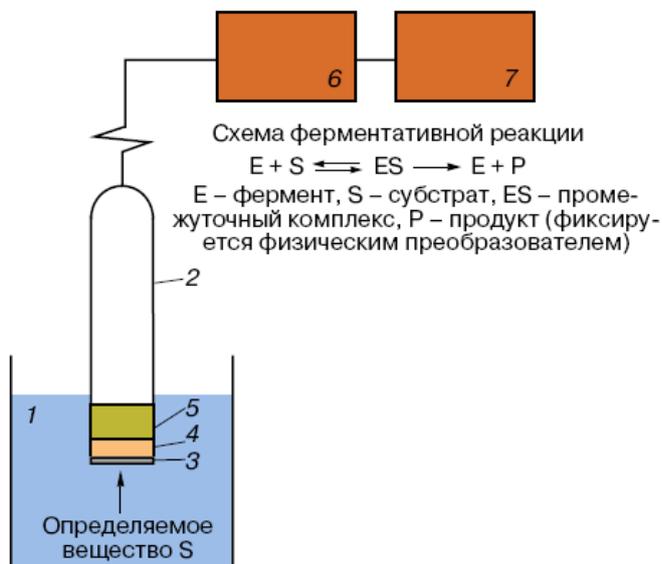


Рисунок 24 - Подробная схема биохимического сенсора: 1 - исследуемый раствор, 2 - корпус биосенсора, 3 - полупроницаемая мембрана (для механического удержания биослоя), 4 - слой биоматериала, 5 - физический преобразователь (электрод, пьезокристалл, оптоволоконный материал и т.д.), 6 - усилитель сигнала, 7 - самописец (дисплей, цифровой или световой указатель).

Характер ферментативной реакции зависит от природы фермента, типа его каталитического действия. Среди ферментов можно выделить оксидоредуктазы, осуществляющие реакции окисления и восстановления, гидролазы, катализирующие гидролиз, трансферазы, вызывающие перенос ацильных, гликозидных и т.п. остатков и т.д.

Многие ферменты дороги и быстро теряют свою активность, так что использование выполненных на их основе биосенсоров не может быть экономически целесообразным. Поэтому более предпочтительно применение бактерий, микроорганизмов и биологических тканей различного происхождения, поскольку при этом отпадает необходимость в предварительном получении и очистке ферментов. К существенным недостаткам таких биосенсоров можно отнести низкую селективность определения вследствие того, что клетки живых организмов фактически являются источником самых разнообразных ферментов. Помимо этого время отклика биосенсоров на основе тканей и микроорганизмов может быть достаточно большим, что также уменьшает их практическую ценность.



Тем не менее развитие методов включения живых клеток в полимеры и твердые носители различной природы и применение такого рода материалов для решения задач медицины, управляемого биосинтеза, анализа – одно из достижений биотехнологии и биоинженерии. С использованием живых иммобилизованных клеток создано много различных биосенсоров.

Принципиальным вопросом при создании клеточных биосенсоров является метод иммобилизации клеток. Первоначально для иммобилизации клеток

использовали материалы природного происхождения: желатину, агар, альгинат кальция, каррагенан. В последние годы разработаны методы включения живых клеток в синтетические полимерные гели. Особенно перспективные результаты получены с использованием метода криоиммобилизации клеток. Клетки при этом сохраняют активность и способны функционировать в течение нескольких месяцев.

Можно отметить несколько удивительных свойств иммобилизованных клеток:

1. Клетки – доступный биологический материал. Используют клетки растений, животных, человека, но наибольшее применение нашли клетки микроорганизмов, которые культивируются, легко воспроизводятся и поддерживаются в чистой культуре. В отличие от ферментов при использовании клеток не требуется дорогостоящих стадий очистки.

2. Имеющиеся методы иммобилизации позволяют получить клетки, сохраняющие около 100% активности ферментов и способные функционировать достаточно длительные промежутки времени. Клетки сохраняют все наиболее важные структуры и проявляют большую стабильность. В некоторых случаях клетки сохраняют жизнеспособность и активность ферментных систем в течение нескольких лет.

3. Клетки сохраняют, как правило, все системы жизнеобеспечения, включая ферментные стадии регенерации кофакторов. Это позволяет проводить сложные последовательные реакции, осуществляя многостадийные процессы.

4. Для многих типов клеток, особенно микробных, разработаны эффективные методы генетических операций, дающие возможность получать мутанты с высоким содержанием того или иного белка или фермента, что дает возможность оперировать с высокоэффективными каталитическими системами. Поскольку клетки сохраняют аппарат биосинтеза белка, потенциально могут быть разработаны высокоэффективные методы генодиагностики.

Современные подходы и техническая база к оценке величины тест-реакции.

Если иметь в виду все разнообразие ферментов, присутствующих и действующих в живом организме и являющихся потенциальными биологическими преобразователями, то существующее сегодня число конструкций биосенсоров может быть увеличено в десятки и даже сотни раз. Биосенсоры получают распространение в биотехнологии. Здесь встречаются трудности, связанные с невысокой термической устойчивостью предложенных устройств, приводящей к дезактивации биослоя, но есть основания полагать, что данный недостаток будет в скором времени преодолен. Так, полагают, что для увеличения срока службы биосенсоров в обозначенных выше условиях можно использовать ферменты, выделенные из термофильных бактерий и одноклеточных водорослей - микроорганизмов, устойчивых к действию высоких температур.

Определенные трудности представляют собой также проблемы градуировки биосенсоров и надежности их показаний. Для улучшения последнего показателя, в частности, предлагается использовать мультисенсорную систему, состоящую из ряда биочипов. Для получения определенной "емкости" надежных данных производится расчет необходимого числа таких датчиков. Однако в целом так называемые метрологические характеристики биосенсоров вполне приемлемы. Относительное стандартное отклонение определяемой концентрации не хуже 10-12 %, притом, что нижняя граница определяемых содержаний достигает 10⁻¹⁰–10⁻¹⁵ моль/л.

Некоторые биосенсоры работают по принципу «да–нет», что вполне приемлемо, когда решается вопрос о присутствии ультрамалых количеств высокотоксичных веществ в объектах окружающей среды. Если определяемые компоненты находятся в сложной смеси или матрице, или же близки по своим свойствам, то при анализе используют хроматографические методы разделения. Контроль за разделением осуществляют с помощью системы детекторов на основе биосенсоров. И здесь получены поразительные результаты: разделяют и количественно определяют оптические активные изомеры, различные сахара (лактозу, фруктозу, глюкозу и т.д.), сложные по структуре биологически активные соединения и т.п.

Использование новых материалов на основе органических полупроводников с включенными в них ферментами позволило создать новое поколение биосенсоров. В некоторых случаях электрохимические биосенсоры удобно реализовывать в форме потенциометрических ячеек с измерением смещения потенциала электрода, возникающего за счет электрохимической реакции. Калибровочная кривая в этом случае коррелирует смещение потенциала и логарифмическое значение концентрации аналита.

Использование биосенсоров в научных исследованиях, медицине, оценке состояния среды и производстве.

Биосенсоры как новые аналитические устройства, позволяющие получать и перерабатывать экспресс-информацию о химическом составе тех или иных объектов, находятся в начале своего развития. Идея распознавания определяемого вещества с помощью иммобилизованного биоматериала оказалась плодотворной – исследователи приобрели новое средство, позволяющее быстро получить достоверную информацию о состоянии окружающей среды и здоровья человека. Некоторые биосенсоры уже получают распространение для индивидуального использования в домашних аптечках (чаще всего для определения сахара в крови). Интерес к биосенсорам непрерывно растет. Только в 1996 г. состоялись четыре крупные международные конференции по биосенсорам.

Существующие в мире биосенсоры медицинского применения можно условно разделить на две категории - стационарные и карманные. К первой группе относятся аппараты, создаваемые для клиники (например, искусственная поджелудочная железа) и клинических лабораторий (иммунная

диагностика, ДНК-диагностика и т.д.). Наряду с ними выпускаются небольшие и достаточно дешевые биосенсоры, позволяющие проводить исследования у постели больного или самостоятельно дома, например, для быстрого определения глюкозы в крови.

По-видимому, самым распространенным в настоящее время является амперометрический биосенсор на основе иммобилизованной глюкозооксидазы для определения уровня сахара в крови. Исторически именно этот биосенсор является самым "древним".

Биосенсоры, основанные на кислородном электроде как физическом трансдьюсере, позволяют определять разнообразные субстраты ферментов: кроме глюкозы - лактаты, L-аминокислоты, салицилаты, оксалаты, пируваты, то есть анионы соответствующих карбоновых кислот. В литературе описаны другие биосенсоры подобного типа, ряд которых применяется на практике.

Биосенсоры, основанные на кислородном электроде как физическом трансдьюсере, позволяют определять разнообразные субстраты ферментов: кроме глюкозы - лактаты, L-аминокислоты, салицилаты, оксалаты, пируваты, то есть анионы соответствующих карбоновых кислот. В литературе описаны другие биосенсоры подобного типа, ряд которых применяется на практике.

Для контроля качества окружающей среды большой интерес представляют биосенсоры на основе иммобилизованных на мембране микроорганизмов, служащих элементом так называемого микробного сенсора.

В частности, в качестве примера таких устройств можно назвать амперометрический сенсор на аммиак (в сточных водах) на основе иммобилизованных нитрифицирующих бактерий и кислородного электрода Кларка. Такой биосенсор полезен при решении вопросов охраны окружающей среды, и в частности при контроле степени очистки промышленных стоков.

Биосенсор на основе иммобилизованных дрожжей и кислородного электрода позволяет определять этанол и метанол, например, в промышленных стоках.

Одна из недавних разработок основана на использовании природного хеморецептора в качестве биосенсоров. Хеморецептор, извлеченный из чувствительных антенн (органелл) голубого морского краба, был прикреплен к ультрамикрорезистору, измеряющему потенциал. В результате был изготовлен новый тип потенциометрического детектора, чрезвычайно быстро реагирующего на ничтожные изменения состава среды, в которую он погружен. Сам голубой краб очень чувствителен к следам тяжелых металлов и живет только в чистой морской воде.

Можно отметить использование биосенсоров на основе гидролаз – ферментов, являющихся катализаторами гидролитического расщепления субстратов. Эти биосенсоры предназначены, как правило, для эколого-аналитического контроля остаточных количеств пестицидов класса фосфорорганических соединений, а также для определения некоторых отравляющих веществ.

На очереди создание биосенсоров, заменяющих рецепторы живых организмов, что позволит создать "искусственные органы" обоняния и вкуса, а также применить указанные разработки для возможно более точной и информативной диагностики ряда заболеваний.

В Институте биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси разрабатывается комплекс методов регистрации физиологического состояния вегетирующего растения.

— Даже если качественно (по существующим представлениям) управлять световым режимом и водным питанием, невозможно добиться того, чтобы создаваемые условия были одинаково приемлемы для всех растений, — поясняет старший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки кандидат биологических наук Владимир Доманский.

Как обеспечить сбор достоверной информации с множества точек и при этом понести минимальные расходы? Мы считаем, что проблему решат размещаемые на растениях миниатюрные сенсоры, модели которых нами уже испытываются. Работа выполняется по ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность».

Правда, иллюзий по поводу того, что перспективная новинка будет должным образом востребована нашим консервативным сельским хозяйством, биофизики не питают. Но на мировом рынке спрос должен быть. Ведь используемые сегодня системы контроля климата ориентированы на поддержание усредненных параметров, а зарубежные отдаленные аналоги белорусской разработки делают пока лишь первые шаги.

Группой Владимира Доманского найдены оригинальные решения и для регулирования светового режима в соответствии с реальными потребностями растений.

Если растению света слишком много или мало, это отражается на интенсивности флуоресценции хлорофилла, благодаря которой живые клетки сбрасывают вовне лишнюю энергию. Это свечение мы фиксируем с помощью миниатюрных датчиков и можем точно сказать, соответствует ли в данный момент уровень освещенности этого участка теплицы физиологическим потребностям конкретной группы растений.

Разработка и производство биосенсоров.

В лаборатории ферментов Институт микробиологии НАН Беларуси под руководством академика А.Г. Лобанка разрабатывается технология производства ферментного препарата глюкозооксидаза, эффективного в составе реагентов для определения глюкозы в биологических жидкостях и в производстве отечественных биосенсоров «Глюкосен» для экспресс-анализа глюкозы анализаторами Глюкометр ГМ-1 и ГМ-2.

В Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси поступило новое оборудование для изготовления импортозамещающего ферментного препарата - глюкозооксидазы, сообщили в институте. Глюкозооксидаза необходима для определения глюкозы в биологических

жидкостях. Ферментный препарат применяется в основном при производстве биосенсоров для измерения уровня сахара в крови больных сахарным диабетом. В нашей стране более 120 тыс. таких больных, и каждому из них необходимо хотя бы один раз в день замерять уровень сахара в крови. В Институте микробиологии каждый месяц выпускается около 20 тыс. единиц глюкозооксидазы. Этого количества недостаточно для удовлетворения внутренних потребностей страны, часть препарата импортируется. Однако скоро отечественная глюкозооксидаза станет более доступной для белорусских потребителей: на базе Института микробиологии запустят современную линию по ее выпуску. Производство ферментного препарата увеличится в несколько раз, при этом стоимость отечественной продукции будет на 10-15% дешевле зарубежных аналогов.

В Институте химии новых материалов НАН Беларуси разработаны методы и технологии получения новых оригинальных материалов различного функционального назначения, в частности формирования композиционных структур с заданными свойствами (износоустойчивость, проводимость, намагниченность) и функциями (запись информации, магнитная сепарация и т.д.) для применения в медицине (биосенсоры, биомаркеры, капсулы), трибологии (защитные покрытия).

1.11. Практическое использование биохимии в спорте.

Профессиональная тренировка в спорте высших достижений немыслима без контроля, том числе и лабораторного. Благодаря клиническим, биохимическим анализам появляется возможность контролировать процесс тренировки и управлять им.

В процессе планирования и построения тренировки тренер получает возможность подтвердить или опровергнуть свои предположения относительно адекватности направления тренировочного процесса, величины (объема, интенсивности) физической нагрузки. Биохимия в руках тренера становится мощным инструментом, расширяющим методологические возможности спортивной практики.

Спортсмен приучает себя ставить цель и достигать ее, опираясь на биохимические показатели и свои ощущения, объективно анализируя нагрузку. Он учится совершенствовать себя, имея мощный инструмент – знание своих индивидуальных констант, объективный уровень обменных процессов (энергетические ресурсы и их направленность, степень закисления внутренней среды организма, гормональный профиль и т.д.). Кроме того, при наличии пытливого ума эти знания помогут спортсмену быстрее освоить профессию тренера, если он решит посвятить ей свою жизнь.

При этом любительский спорт, особенно возрастной, получает возможность точно дозировать физическую нагрузку, соизмеряя ее с обменными процессами и уровнем здоровья.

Но авторы призывают взвешенно относиться как к избыточному, так и к недостаточному биохимическому обследованию при физической нагрузке. Необходимо четко следовать в каждом конкретном случае выработанному алгоритму биохимического сопровождения тренировочного процесса и непременно анализу полученных данных. Также стоит обратить внимание на контрольные цифры референтных значений, приведенных в результатах анализа, так как методы в разных лабораториях могут быть разными.

В книге не рассматриваются многие положения биохимии клинической медицины. В биохимическом аспекте даны понятия положений, касающиеся только спорта и тренировочного процесса.

Для того чтобы не нагружать спортсмена и лаборанта избыточным количеством анализов, снизить коммерческую составляющую обследования, необходимо предварительно посоветоваться с врачом-биохимиком, который имеет практический опыт работы в медицине спорта.

Биохимия спорта. Тактика и опыт использования биохимии в спорте

Тактика. Успехи биохимии, возрастание роли биохимических исследований, увеличение числа биохимических тестов привели к значительному росту как общего числа выполняемых лабораторных биохимических анализов, так и приходящихся на одного спортсмена. Будучи в основном позитивным, ведущим к получению более полной объективной информации о тренировочном процессе и здоровье спортсмена, этот процесс имеет и негативные стороны: увеличение частоты венепункций, потенциально повышающих риск распространения гепатита; увеличение материальных затрат и др. Необходимо стремиться к уравниванию клинических выгод и материальных расходов, связанных с развитием биохимии спорта. Одним из важных средств достижения этой цели являются правильная ориентация спортивного врача, тренера, биохимика в возможностях современной биохимии спорта и определение наиболее рациональных путей их использования в практике медицины спорта.

Точность диагностики повышается пропорционально не общему числу лабораторных исследований, а росту осознанной и использованной врачом и тренером информации о наиболее существенной для тренировочного процесса (или диагностики патологических состояний) динамики химического состава биожидкостей. Клиническая и экономическая важность сокращения сроков диагностического обследования также стимулируют тенденцию к рационализации лабораторного и, в частности, биохимического обследования.

Рациональная тактика биохимического обследования спортсмена вытекает из общих тактических принципов клинической лабораторной диагностики, которые состоят в следующем.

1. Лабораторные тесты, назначаемые обследуемому спортсмену, должны соответствовать целям и задачам определенных этапов подготовки спортсмена (тренировочного процесса) и самого соревнования, а также клиническим целям:

- а) выявление ранее не наблюдавшегося отклонения от нормы – профилактическое обследование;
- б) диагностическое, большей частью дифференциально-диагностическое обследование;
- в) оценка эффективности принятых мер;
- г) оценка степени восстановления нарушенных функций – прогностическое обследование, диспансерное наблюдение.

Цель исследования должна определять набор, комбинацию и частоту назначения тестов.

2. Поиск ранее не наблюдавшейся патологии может проводиться как «вслепую» – по широкому кругу тестов, так и направленно – по узкому набору тестов. Наиболее рационален целенаправленный поиск при выявлении фактора риска развития патологии. Находит распространение, детерминированный в отношении всего контингента так называемый «вступительный скрининг», т.е. проведение каждому зачисленному в сборную команду спортсмену еще до знакомства с врачом заранее отобранного и установленного стандартного набора биохимических тестов.

3. Детерминированное назначение одновременного выполнения комплекса (конstellации) тестов предпочтительнее последовательного назначения этих же тестов, растянутого во времени. В состав комплекса обследования должны подбираться тесты, отвечающие задаче определенного этапа подготовки, его энергообеспечению и дифференциации от других форм в соответствии с наиболее высокими значениями диагностической чувствительности, специфичности и эффективности лабораторных тестов по отношению к данной нагрузке.

4. Более высокой формой рационализации лабораторной диагностики являются дифференциальные диагностические программы, включающие несколько комплексов, применяемых поэтапно. Комплекс 1-го этапа имеет ориентирующий характер; в зависимости от его результатов включается один из альтернативных комплексов 2-го (если нужно, и 3-го) этапа, позволяющий получить наиболее точную прогностическую информацию.

5. Лабораторные тесты должны назначаться с учетом их диагностической ценности и при различных стадиях патологического процесса у спортсмена (функциональное или нефункциональное перенапряжение, перетренированность, скрытое течение болезни и т.д.) и возможностей наблюдения течения этих процессов.

6. Стандартные нагрузочные тесты (в т.ч. и с фармакологическими пробами) обладают большей способностью выявлять скрытые и неявные изменения биохимических параметров, резервные возможности органов и систем, чем исследования в состоянии покоя. Назначение нагрузочных тестов должно проводиться с учетом состояния и возможных отрицательных эффектов пробы.

7. При биохимическом контроле результатов тренировочного действия определенной направленности следует учитывать возможное влияние фармакологической коррекции, лечебных воздействий, диагностических мероприятий.

Опыт использования биохимических исследований в практике спорта. Опыт диктует следующие принципы, важные для правильного понимания результатов этих исследований.

1. Для целей спорта и клинической диагностики состояний, возникающих в практике спорта, представляют интерес: химический состав биологических жидкостей и тканей организма, распределение жидкости и химических компонентов между органами и тканями, процессы превращения веществ в целом организме и различных его органах и их регуляция с помощью ферментов и биологически активных соединений. Исследование может проводиться в пробах биологических жидкостей (кровь, моча, цереброспинальная жидкость, пот, пищеварительные соки и т.д.), патологических жидкостях (отечной, внутрисуставной и т.д.), а также в пробах выдыхаемого воздуха или с помощью введенных в организм датчиков (например, ионоселективных электродов).

2. При биохимическом исследовании биологических жидкостей следует помнить, что каждый отдельный определяемый показатель отражает деятельность многих органов и тканей, а также собственную функцию данной жидкости (транспортную, метаболическую, гомеостатическую, экскреторную и т.д.). Поэтому при интерпретации полученных результатов следует их рассматривать в свете одновременного действия многих факторов, нередко конкурирующих друг с другом, оценивать их относительное влияние на изучаемый биохимический параметр.

3. Все процессы жизнедеятельности подвержены колебательным изменениям, отражающим периодические воздействия внешних факторов (изменение солнечной и атмосферной активности, смена времен года, лунные месяцы, смена времен суток, прием пищи). Некоторые параметры испытывают очень существенные колебания, которые следует учитывать при трактовке результатов и сопоставлении данных, полученных в различные периоды соответствующего ритма. К ним могут относиться изменения циркадианного характера при смене часовых поясов, высоты над уровнем моря, изменение режима дня и т.д.

4. Биохимический состав биожидкостей и его изменения под влиянием стандартных нагрузок подвержены индивидуальным колебаниям у различных людей, отражая влияние пола, возраста, характера питания, характера и условий профессионального труда спортсмена, образа жизни, вредных привычек, генетических особенностей и т.п.

Учет этих факторов обязателен при трактовке результатов биохимических исследований во избежание ошибочных диагностических, прогностических решений.

5. При решении вопроса об отклонении биохимического параметра от нормы правильнее ориентироваться не на средние показатели, а на референтные (справочные) величины, получаемые с учетом влияния факторов, указанных в п.3 и 4. Сейчас пишут калькированно с английского – «референсные».

6. Для получения результатов биохимического анализа, правильно отражающих происходящие в организме изменения, необходимо обеспечить строгое соблюдение правил взятия проб биоматериала, условий его хранения и транспортировки в лабораторию. Выполнение этих правил полностью зависит от персонала и должно быть под постоянным контролем врача и тренера.

7. Трактую результаты биохимических исследований, следует учитывать условия, в которых находится обследуемый спортсмен перед взятием пробы биоматериала, в том числе степень физической активности, положение тела (стоя, лежа), другие диагностические исследования (введение контрастных материалов, проведение нагрузочных проб, некоторые виды обследования и т.п.), лечебные меры (лекарственное, физиотерапевтическое, хирургическое лечение).

8. Диагностическое значение результата биохимического исследования зависит от степени связи исследуемого параметра с уровнем физической нагрузки, патологическим процессом. Поскольку большинство биохимических параметров отражает влияние не одного, а нескольких факторов (п.2), большая часть измененных показателей при биохимических исследованиях должна рассматриваться с позиций вероятностного, многофакторного подхода, и прогностическая ценность этих отклонений от нормы для каждого параметра должна рассчитываться на основе математического анализа значительного числа аналогичных случаев. При этом должны учитываться величины диагностической чувствительности, специфичности, эффективности лабораторных тестов.

9. Результаты биохимических исследований являются лишь частью сведений об обследуемом человеке. Учитывая высокую вариабельность физиологических и патологических процессов, в практике спортивной медицины в большинстве случаев нельзя опираться только на данные биохимического исследования. Однако тесная связь биохимических параметров с наиболее существенными процессами метаболизма позволяет в ряде случаев выявлять лабораторными методами уровень возможностей спортсмена, оценить энергетические ресурсы, направленность и тенденции метаболических сдвигов, гормональный фон, что может существенно расширить методологические возможности спортивной практики.

При адаптации организма к физическим нагрузкам, перетренировке, а также при патологических состояниях в организме изменяется обмен веществ, что приводит к появлению в различных тканях и биологических жидкостях отдельных метаболитов (продуктов обмена веществ), которые отражают функциональные изменения и могут служить биохимическими тестами либо

показателями их характеристики. Поэтому в спорте наряду с медицинским, педагогическим, психологическим и физиологическим контролем используется биохимический контроль за функциональным состоянием спортсмена.

В практике спорта высших достижений обычно проводятся комплексные научные обследования спортсменов, дающие полную и объективную информацию о функциональном состоянии отдельных систем и всего организма, о его готовности выполнять физические нагрузки. Такой контроль на уровне сборных команд страны осуществляют комплексные научные группы (КНГ), в состав которых входит несколько специалистов: биохимик, физиолог, психолог, врач, тренер.

Задачи, виды и организация биохимического контроля.

Определение биохимических показателей обмена веществ позволяет решать следующие задачи комплексного обследования: контроль за функциональным состоянием организма спортсмена, которое отражает эффективность и рациональность выполняемой индивидуальной тренировочной программы, наблюдение за адаптационными изменениями основных энергетических систем и функциональной перестройкой организма в процессе тренировки, диагностика предпатологических и патологических изменений метаболизма спортсменов. Биохимический контроль позволяет также решать такие частные задачи, как выявление реакции организма на физические нагрузки, оценка уровня тренированности, адекватности применения фармакологических и других восстанавливающих средств, роли энергетических метаболических систем в мышечной деятельности, воздействия климатических факторов и др. В связи с этим в практике спорта используется биохимический контроль на различных этапах подготовки спортсменов.

В годичном тренировочном цикле подготовки квалифицированных спортсменов выделяют разные виды биохимического контроля:

- текущие обследования (ТО), проводимые повседневно в соответствии с планом подготовки;
- этапные комплексные обследования (ЭКО), проводимые 3—4 раза в год;
- углубленные комплексные обследования (УКО), проводимые 2 раза в год;
- обследование соревновательной деятельности (ОСД).

На основании текущих обследований определяют функциональное состояние спортсмена — одно из основных показателей тренированности, оценивают уровень срочного и отставленного тренировочного эффекта физических нагрузок, проводят коррекцию физических нагрузок в ходе тренировок.

В процессе этапных и углубленных комплексных обследований спортсменов с помощью биохимических показателей можно оценить кумулятивный тренировочный эффект, причем биохимический контроль дает тренеру, педагогу или врачу быструю и достаточно объективную информацию

о росте тренированности и функциональных системах организма, а также других адаптационных изменениях.

При организации и проведении биохимического обследования особое внимание уделяется выбору тестирующих биохимических показателей: они должны быть надежными либо воспроизводимыми, повторяющимися при многократном контрольном обследовании, информативными, отражающими сущность изучаемого процесса, а также валидными либо взаимосвязанными со спортивными результатами.

В каждом конкретном случае определяются разные тестирующие биохимические показатели обмена веществ, поскольку в процессе мышечной деятельности по-разному изменяются отдельные звенья метаболизма. Первостепенное значение приобретают показатели тех звеньев обмена веществ, которые являются основными в обеспечении спортивной работоспособности в данном виде спорта.

Немаловажное значение в биохимическом обследовании имеют используемые методы определения показателей метаболизма, их точность и достоверность. В настоящее время в практике спорта широко применяются лабораторные экспресс-методы определения многих (около 60) различных биохимических показателей в плазме крови с использованием портативного прибора IP-400 швейцарской фирмы «Доктор Ланге» или других фирм. К экспресс-методам определения функционального состояния спортсменов относится также предложенный академиком В.Г. Шахба-зовым новый метод определения энергетического состояния человека, в основу которого положены изменения биоэлектрических свойств ядер эпителиальных клеток в зависимости от физиологического состояния организма. Данный метод позволяет выявить нарушение гомеостаза организма, состояние утомления и другие изменения при мышечной деятельности.

Контроль за функциональным состоянием организма в условиях учебно-тренировочного сбора можно осуществлять с помощью специальных диагностических экспресс-наборов для биохимического анализа мочи и крови. Основаны они на способности определенного вещества (глюкозы, белка, витамина С, кетоновых тел, мочевины, гемоглобина, нитратов и др.) реагировать с нанесенными на индикаторную полоску реактивами и изменять окраску. Обычно наносится капля исследуемой мочи на индикаторную полоску «Глюкотеста», «Пентафана», «Меди-теста» или других диагностических тестов и через 1 мин ее окраска сравнивается с индикаторной шкалой, прилагаемой к набору.

Одни и те же биохимические методы и показатели могут быть использованы для решения различных задач. Так, например, определение содержания лактата в крови используется при оценке уровня тренированности, направленности и эффективности применяемого упражнения, а также при отборе лиц для занятий отдельными видами спорта.

В зависимости от решаемых задач изменяются условия проведения биохимических исследований. Поскольку многие биохимические показатели у тренированного и не тренированного организма в состоянии относительного покоя существенно не различаются, для выявления их особенностей проводят обследование в состоянии покоя утром натощак (физиологическая норма), в динамике физической нагрузки либо сразу после нее, а также в разные периоды восстановления.

При обследовании спортсменов применяются различные типы тестирующих физических нагрузок, которые могут быть стандартными и максимальными (предельными).

Стандартные физические нагрузки — это нагрузки, при которых ограничиваются количество и мощность выполняемой работы, что обеспечивается с помощью специальных приборов — эргометров. Наиболее часто используют степэргометрию (восхождение в разном темпе на ступеньку или лестницу разной высоты, например, Гарвардский степ-тест), велоэргометрию (фиксированную работу на велоэргометре), нагрузки на тредмиле — движущейся с фиксируемой скоростью ленте. В настоящее время существуют диагностические комплексы, позволяющие выполнять специальную дозированную физическую нагрузку: плавательный тредмил, гребные эргометры, инерционные велоэргометры и др. Стандартные физические нагрузки способствуют выявлению индивидуальных метаболических различий и используются для характеристики уровня тренированности организма.

Максимальные физические нагрузки применяются при выявлении уровня специальной тренированности спортсмена на разных этапах подготовки. В данном случае используются нагрузки, наиболее характерные для данного вида спорта. Выполняются они с максимально возможной интенсивностью для данного упражнения.

При выборе тестируемых нагрузок следует учитывать, что реакция организма человека на физическую нагрузку может зависеть от факторов, непосредственно не связанных с уровнем тренированности, в частности от вида тестируемого упражнения, специализации спортсмена, а также от окружающей обстановки, температуры среды, времени суток и др. Выполняя привычную для себя работу, спортсмен может осуществить большой ее объем и добиться значительных метаболических сдвигов в организме. Особенно отчетливо это проявляется при тестировании анаэробных возможностей, весьма специфичных и в наибольшей степени проявляющихся только при работе, к которой спортсмен адаптирован. Следовательно, для велосипедистов наиболее подходящими являются велоэргометрические тесты, для бегунов — беговые и т. д. Однако это не означает, что для легкоатлетов или спортсменов других видов спорта нельзя использовать велоэргометрические тесты, которые позволяют наиболее точно учитывать объем выполненной работы. Однако велосипедисты при велоэргометрическом тестировании будут иметь

преимущество по сравнению с представителями других видов спорта той же квалификации и специализирующихся в упражнениях, относящихся к той же зоне мощности.

Используемые тестируемые нагрузки, специфические по мощности и продолжительности, должны соответствовать нагрузкам, используемым спортсменом в процессе тренировки. Так, для легкоатлетов-бегунов, специализирующихся на короткие и сверхдлинные дистанции, тестирующие нагрузки должны быть разными, способствующими проявлению их основных двигательных качеств — скорости либо выносливости. Важным условием применения тестируемых физических нагрузок является точное установление их мощности либо интенсивности и длительности.

На результаты исследования влияет также температура окружающей среды, время тестирования и состояние здоровья. Более низкая работоспособность наблюдается при повышенной температуре среды, а также в утреннее и вечернее время. К тестированию, как и к занятиям, спортом, особенно с максимальными нагрузками, должны допускаться только полностью здоровые спортсмены, поэтому врачебный осмотр должен предшествовать другим видам контроля. Контрольное биохимическое тестирование проводится утром натощак после относительного отдыха в течение суток. При этом должны соблюдаться примерно одинаковые условия внешней среды, которые влияют на результаты тестирования.

Изменение биохимических показателей под воздействием физических нагрузок зависит от степени тренированности, объема выполненных нагрузок, их интенсивности и анаэробной или аэробной направленности, а также от пола и возраста обследуемых. После стандартной физической нагрузки значительные биохимические сдвиги обнаруживаются у менее тренированных людей, а после максимальных — у высокотренированных. При этом после выполнения специфических для спортсменов нагрузок в условиях соревнования или в виде прикидок в тренированном организме возможны значительные биохимические изменения, которые не характерны для нетренированных людей.

Объекты исследования и основные биохимические показатели

Объектами биохимического исследования являются выдыхаемый воздух и биологические жидкости — кровь, моча, слюна, пот, а также мышечная ткань.

Выдыхаемый воздух — один из основных объектов исследования процессов энергетического обмена в организме, использования отдельных энергетических источников в энергообеспечении мышечной деятельности. В нем определяют количество потребляемого кислорода и выдыхаемого углекислого газа. Соотношение этих показателей в определенной мере отражает интенсивность процессов энергообмена, долю в них анаэробных и аэробных механизмов ресинтеза АТФ.

Кровь используется как один из наиболее важных объектов биохимических исследований, так как в ней отражаются все метаболические

изменения в тканевых жидкостях и лимфе организма. По изменению состава крови либо жидкой ее части — плазмы можно судить о гомеостатическом состоянии внутренней среды организма или изменении его при спортивной деятельности (Таблица 2).

Для многих исследований требуется небольшое количество крови (0,01—0,05 мл), поэтому берут ее из безымянного пальца руки либо из ребра мочки уха.

Таблица 2 – Основные химические компоненты цельной крови и плазмы здорового взрослого человека.

Компоненты крови	Цельная кровь	Плазма
Вода, %	75-85	90-91
Сухой остаток (белок крови), %	15-25	9-10
Общий белок, г/л	—	65-80
Гемоглобин, г/л	120 - 140 (женщины) 140 - 160 (мужчины)	—
Гематокрит, мл/100 мл	37 - 47 (женщины) 40 - 54 (мужчины)	—
Глобулины, г/л	—	20-30
Альбумины, г/л	—	40-50
Мочевина, ммоль/л	3,30-6,60	3,30-6,60
Мочевая кислота, ммоль/л	0,18-0,24	0,24-0,29
Креатин, ммоль/л	0,23-0,38	0,08-0,11
Креатинин, ммоль/л	0,06-0,067	0,06-0,067
Глюкоза, ммоль/л	3,30-5,50	3,60-5,50
Молочная кислота, ммоль/л	—	1,00-2,50
Пировиноградная кислота, ммоль/л	—	0,07-0,14
Нейтральные жиры, ммоль/л	1,00-2,60	1,20—2,80
Свободные жирные кислоты, ммоль/л	—	0,10-0,40
Холестерин общий, ммоль/л	3,90-5,20	3,90-6,50
Кетоновые тела, ммоль/л	—	8-30
Ацетоуксусная кислота, ммоль/л	—	0,05-0,19
Ацетон, ммоль/л	0,20	0,20-0,30
Лимонная кислота, ммоль/л	—	0,10-0,15
Аскорбиновая кислота, ммоль/л	—	0,05-0,10
Билирубин общий, ммоль/л	—	4—26
pH	7,35—7,45	—

После выполненной физической работы забор крови рекомендуется проводить спустя 3—7 мин, когда наступают наибольшие биохимические изменения в ней.

При физических нагрузках и воздействии других факторов среды, а также при патологических изменениях обмена веществ или после применения фармакологических средств содержание отдельных компонентов крови существенно изменяется. Следовательно, по результатам анализа крови можно охарактеризовать состояние здоровья человека, уровень его тренированности,

протекание адаптационных процессов и др. В последние годы в связи с угрозой заражения СПИДом исследования крови необходимо проводить с соблюдением всех предусмотренных мер защиты.

Моча в определенной степени отражает работу почек — основного выделительного органа организма, а также динамику обменных процессов в различных органах и тканях. Поэтому по изменению количественного и качественного ее состава можно судить о состоянии отдельных звеньев обмена веществ, избыточному их поступлению, нарушению гомеостатических реакций в организме, в том числе связанных с мышечной деятельностью (Таблица 3). С мочой из организма выводятся избыток воды, многие электролиты, промежуточные и конечные продукты обмена веществ, гормоны, витамины, чужеродные вещества. Суточное количество мочи (диурез) в норме в среднем составляет 1,5 л. Мочу собирают в течение суток, что вносит определенные затруднения в проведение исследований. Иногда мочу берут дробными порциями (например, через 2 ч), при этом фиксируют порции, полученные до выполнения физической работы и после нее. Моча не может быть достоверным объектом исследования после кратко временных тренировочных нагрузок, так как сразу после этого весьма сложно собрать необходимое для ее анализа количество.

При различных функциональных состояниях организма в моче могут появляться химические вещества, не характерные для нормы: глюкоза, белок, кетоновые тела, желчные пигменты, форменные элементы крови и др. Определение этих веществ в моче может использоваться в биохимической диагностике отдельных заболеваний, а также в практике спорта для контроля эффективности тренировочного процесса, состояния здоровья спортсмена.

Слюна обычно используется параллельно с другими биохимическими объектами. В слюне определяют электролиты (N_3 и K), активность ферментов (амилазы), рН. Существует мнение, что слюна, обладая меньшей, чем кровь, буферной емкостью, лучше отражает изменения кислотно-щелочного равновесия организма человека. Однако, как объект исследования слюна не получила широкого распространения, поскольку состав ее зависит не только от физических нагрузок и связанных с ними изменений внутритканевого обмена веществ, но и от состояния сытости («голодная» или «сытая» слюна).

Пот в отдельных случаях представляет интерес как объект исследования. Необходимое для анализа количество пота собирается с помощью хлопчатобумажного белья или полотенца, которое замачивают в дистиллированной воде для извлечения различных компонентов пота. Экстракт выпаривают в вакууме и подвергают анализу.

Таблица 3 – Химический состав мочи здорового взрослого человека.

Компоненты мочи г/сут	Содержание в норме ммоль/сут	
Органические вещества:	22-46	—
мочевина	20-35	333-583
аминокислоты	ДО 1,1	8,8
креатинин	1,0-2,0	8,8—17,7
мочевая кислота	0,2—1,2	1,2—7,1
глюкоза	0	0
белок	0	0
Неорганические вещества:	15-25	—
хлорид	3,6-9,0	100-250
фосфор неорганический	0,9—1,3	29-45
фосфаты	2,0-6,7	—
натрий	3,0-6,0	130-260
калий	1,5-3,2	38—82
кальций (общий)	0,1-0,25	2,5-6,2
магний	0,1-0,2	4,2-8,4
бикарбонаты (при рН 5,6)	—	0,5 ммоль/л
азот аммиака	0,5-1,0	36—71
РН	4,6-8,0	—

Мышечная ткань является очень показательным объектом биохимического контроля мышечной деятельности, однако используется редко, так как образец мышечной ткани необходимо брать методом игольчатой биопсии. Для этого над исследуемой мышцей делается небольшой разрез кожи и с помощью специальной иглы берется кусочек (проба) мышечной ткани (2—3 мг), которая сразу замораживается в жидком азоте и в дальнейшем подвергается структурному и биохимическому анализу. В пробах определяют количество сократительных белков (актина и миозина), АТФ-азную активность миозина, показатели энергетического потенциала (содержание АТФ, гликогена, креатинфосфата), продукты энергетического обмена, электролиты и другие вещества. По их содержанию судят о составе и функциональной активности мышц, ее энергетическом потенциале, а также изменениях, которые происходят при воздействии однократной физической нагрузки или долговременной тренировки.

При биохимическом обследовании в практике спорта используются следующие биохимические показатели:

- энергетические субстраты (АТФ, КрФ, глюкоза, свободные жирные кислоты);
- ферменты энергетического обмена (АТФ-аза, КрФ-киназа, цитохромоксидаза, лактатдегидрогеназа и др.);
- промежуточные и конечные продукты обмена углеводов, липидов и белков (молочная и пировиноградная кислоты, кетоновые тела, мочевины,

креатинин, креатин, мочевая кислота, углекислый газ и др.); показатели кислотно-основного состояния крови (рН крови, парциальное давление CO₂, резервная щелочность или избыток буферных оснований и др.);

- регуляторы обмена веществ (ферменты, гормоны, витамины, активаторы, ингибиторы);

- минеральные вещества в биохимических жидкостях (например, бикарбонаты и соли фосфорной кислоты определяют для характеристики буферной емкости крови);

- содержание общего белка, количество и соотношение белковых фракций в плазме крови;

- анаболические стероиды и другие запрещенные вещества в практике спорта (допинги), выявление которых — задача допингового контроля.

Основные биохимические показатели состава крови и мочи, их изменение при мышечной деятельности.

Показатели углеводного обмена

Глюкоза. Содержание глюкозы в крови поддерживается на относительно постоянном уровне специальными регуляторными механизмами в пределах 3,3—5,5 ммоль/л (80—120 мг%). Изменение ее содержания в крови при мышечной деятельности индивидуально и зависит от уровня тренированности организма, мощности и продолжительности физических упражнений. Кратковременные физические нагрузки субмаксимальной интенсивности могут вызывать повышение содержания глюкозы в крови за счет усиленной мобилизации гликогена печени. Длительные физические нагрузки приводят к снижению содержания глюкозы в крови. У нетренированных лиц это снижение более выражено, чем у тренированных. Повышенное содержание глюкозы в крови свидетельствует об интенсивном распаде гликогена печени либо относительно малом использовании глюкозы тканями, а пониженное ее содержание — об исчерпании запасов гликогена печени либо интенсивном использовании глюкозы тканями организма.

По изменению содержания глюкозы в крови судят о скорости аэробного окисления ее в тканях организма при мышечной деятельности и интенсивности мобилизации гликогена печени. Этот показатель обмена углеводов редко используется самостоятельно в спортивной диагностике, так как уровень глюкозы в крови зависит не только от воздействия физических нагрузок на организм, но и от эмоционального состояния человека, гуморальных механизмов регуляции, питания и других факторов.

У здорового человека в моче глюкоза отсутствует, однако может появиться при интенсивной мышечной деятельности, эмоциональном возбуждении перед стартом и при избыточном поступлении углеводов с пищей (алиментарная глюкозурия) в результате увеличения ее уровня в крови (состояние гипергликемии). Появление глюкозы в моче при физических нагрузках свидетельствует об интенсивной мобилизации гликогена печени. Постоянное

наличие глюкозы в моче является диагностическим тестом заболевания сахарным диабетом.

Молочная кислота. Гликолитический механизм ресинтеза АТФ в скелетных мышцах заканчивается образованием молочной кислоты, которая затем поступает в кровь. Выход ее в кровь после прекращения работы происходит постепенно, достигая максимума на 3—7-й минуте после окончания работы. Содержание молочной кислоты в крови в норме в состоянии относительного покоя составляет 1—1,5 ммоль/л (15—30 мг%) и существенно возрастает при выполнении интенсивной физической работы. При этом накопление ее в крови совпадает с усиленным образованием в мышцах, которое существенно повышается после напряженной кратковременной нагрузки и может достичь около 30 ммоль/кг массы при изнеможении. Количество молочной кислоты больше в венозной крови, чем в артериальной. С увеличением мощности нагрузки содержание ее в крови может возрасти у нетренированного человека до 5—6 ммоль/л, у тренированного — до 20 ммоль/л и выше. В аэробной зоне физических нагрузок лактат составляет 2—4 ммоль/л, в смешанной — 4—10 ммоль/л, в анаэробной — более 10 ммоль/л. Условная граница анаэробного обмена соответствует 4 ммоль лактата в 1 л крови и обозначается как порог анаэробного обмена (ПАНО), или лактатный порог (ЛП). Снижение содержания лактата у одного и того же спортсмена при выполнении стандартной работы на разных этапах тренировочного процесса свидетельствует об улучшении тренированности, а повышение — об ухудшении. Значительные концентрации молочной кислоты в крови после выполнения максимальной работы свидетельствуют о более высоком уровне тренированности при хорошем спортивном результате или о большей метаболической емкости гликолиза, большей устойчивости его ферментов к смещению рН в кислую сторону. Таким образом, изменение концентрации молочной кислоты в крови после выполнения определенной физической нагрузки связано с состоянием тренированности спортсмена. По изменению ее содержания в крови определяют анаэробные гликолитические возможности организма, что важно при отборе спортсменов, развитии их двигательных качеств, контроле тренировочных нагрузок и хода процессов восстановления организма.

Показатели липидного обмена

Свободные жирные кислоты. Являясь структурными компонентами липидов, уровень свободных жирных кислот в крови отражает скорость липолиза триглицеридов в печени и жировых депо. В норме содержание их в крови составляет 0,1—0,4 ммоль/л и увеличивается при длительных физических нагрузках.

По изменению содержания СЖК в крови контролируют степень подключения липидов к процессам энергообеспечения мышечной деятельности, а также экономичность энергетических систем или степень сопряжения между липидным и углеводным обменом. Высокая степень

сопряжения этих механизмов энергообеспечения при выполнении аэробных нагрузок является показателем высокого уровня функциональной подготовки спортсмена.

Кетоновые тела. Образуются они в печени из ацетил-КоА при усиленном окислении жирных кислот в тканях организма. Кетоновые тела из печени поступают в кровь и доставляются к тканям, в которых большая часть используется как энергетический субстрат, а меньшая выводится из организма. Уровень кетоновых тел в крови в определенной степени отражает скорость окисления жиров. Содержание кетоновых тел в крови в норме относительно небольшое — 8 ммоль/л. При накоплении в крови до 20 ммоль/л (кетонемия) они могут появиться в моче, тогда как в норме в моче кетоновые тела не выявляются. Появление их в моче (кетонурия) у здоровых людей наблюдается при голодании, исключении углеводов из рациона питания, а также при выполнении физических нагрузок большой мощности или длительности. Этот показатель имеет также диагностическое значение при выявлении заболевания сахарным диабетом, тиреотоксикозом.

По увеличению содержания кетоновых тел в крови и появлению их в моче определяют переход энергообразования с углеводных источников на липидные при мышечной активности. Более раннее подключение липидных источников указывает на экономичность аэробных механизмов энергообеспечения мышечной деятельности, что взаимосвязано с ростом тренированности организма.

Холестерин. Это представитель стероидных липидов, не участвующий в процессах энергообразования в организме. Содержание холестерина в плазме крови в норме составляет 3,9—6,5 ммоль/л и зависит от пола (у мужчин выше), возраста (у детей ниже), диеты (у вегетарианцев ниже), двигательной активности. Постоянное увеличение уровня холестерина и его отдельных липопротеидных комплексов в плазме крови служит диагностическим тестом развития тяжелого заболевания — атеросклероза, сопровождающегося поражением кровеносных сосудов. Установлена зависимость коронарных нарушений от концентрации холестерина в крови. При поражении сосудов сердца наблюдается ишемия миокарда или инфаркт, а сосудов мозга — инсульты, сосудов ног — атрофия конечностей. В работах последних лет показано, что выведению из организма человека холестерина способствуют пищевые волокна (клетчатка), содержащиеся в овощах, фруктах, черном хлебе и других продуктах, а также лецитин и систематические занятия физическими упражнениями.

Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). При физических нагрузках усиливаются процессы перекисного окисления липидов и накапливаются продукты этих процессов, что является одним из факторов, лимитирующих физическую работоспособность. Поэтому при биохимическом контроле реакции организма на физическую нагрузку, оценке специальной подготовленности спортсмена, выявлении глубины биодеструктивных

процессов при развитии стресс-синдрома проводят анализ содержания продуктов перекисного окисления в крови: малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, а также активность ферментов глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и каталазы.

Фосфолипиды. Содержание фосфолипидов в норме в крови составляет 1,52—3,62 г/л. Повышение их уровня в крови наблюдается при диабете, заболеваниях почек, гипофункции щитовидной железы и других нарушениях обмена, а понижение — при жировой дистрофии печени, т. е. когда поражаются структуры печени, в которых они синтезируются. Для стимуляции синтеза фосфолипидов и снижения содержания в крови триглицеридов необходимо увеличить потребление с пищей липотропных веществ. Поскольку длительные физические нагрузки сопровождаются жировой дистрофией печени, в спортивной практике иногда используют контроль содержания триглицеридов и фосфолипидов в крови.

Показатели белкового обмена

Гемоглобин. Основным белком эритроцитов крови является гемоглобин, который выполняет кислородтранспортную функцию. Он содержит железо, связывающее кислород воздуха. Концентрация гемоглобина в крови зависит от пола и составляет в среднем 7,5—8,0 ммоль/л (120—140 г/л) — у женщин и 8,0—10,0 ммоль/л (140—160 г/л) — у мужчин, а также от степени тренированности. При мышечной деятельности резко повышается потребность организма в кислороде, что удовлетворяется более полным извлечением его из крови, увеличением скорости кровотока, а также постепенным увеличением количества гемоглобина в крови за счет изменения общей массы крови. С ростом уровня тренированности спортсменов в видах спорта на выносливость концентрация гемоглобина в крови у женщин возрастает в среднем до 130—150 г/л, у мужчин — до 160—180 г/л. Увеличение содержания гемоглобина в крови в определенной степени отражает адаптацию организма к физическим нагрузкам в гипоксических условиях.

При интенсивных тренировках, особенно у женщин, занимающихся циклическими видами спорта, а также при нерациональном питании происходит разрушение эритроцитов крови и снижение концентрации гемоглобина до 90 г/л и ниже, что рассматривается как железодефицитная «спортивная анемия». В таком случае следует изменить программу тренировок, а в рационе питания увеличить содержание белковой пищи, железа и витаминов группы В.

По содержанию гемоглобина в крови можно судить об аэробных возможностях организма, эффективности аэробных тренировочных занятий, состоянии здоровья спортсмена.

Миоглобин. В саркоплазме скелетных и сердечной мышц находится высокоспециализированный белок, выполняющий функцию транспорта кислорода подобно гемоглобину. Содержание миоглобина в крови в норме незначительное (10—70 нг/л). Под влиянием физических нагрузок, при

патологических состояниях организма он может выходить из мышц в кровь, что приводит к повышению его содержания в крови и появлению в моче (миоглобинурия). Количество миоглобина в крови зависит от объема выполненной физической нагрузки, а также от степени тренированности спортсмена. Поэтому данный показатель может быть использован для диагностики функционального состояния работающих скелетных мышц.

Актин. Содержание актина в скелетных мышцах в качестве структурного и сократительного белка существенно увеличивается в процессе тренировки. По его содержанию в мышцах можно было бы контролировать развитие скоростно-силовых качеств спортсмена при тренировке, однако определение его содержания в мышцах связано с большими методическими затруднениями. Тем не менее после выполненных физических нагрузок отмечается появление актина в крови, что свидетельствует о разрушении либо обновлении миофибриллярных структур скелетных мышц. В крови содержание актина определяют радиоиммунологическим методом и по его изменению судят о переносимости физических нагрузок, интенсивности восстановления миофибрилл после мышечной работы.

Альбумины и глобулины. Это низкомолекулярные основные белки плазмы крови. Альбумины составляют 50—60 % всех белков сыворотки крови, глобулины — 35—40 %. Они выполняют разнообразные функции в организме: входят в состав иммунной системы, особенно глобулины, и защищают организм от инфекций, участвуют в поддержании рН крови, транспортируют различные органические и неорганические вещества, используются для построения других веществ. Количественное соотношение их в сыворотке крови в норме относительно постоянно и отражает состояние здоровья человека. Соотношение этих белков изменяется при утомлении, многих заболеваниях и может использоваться в спортивной медицине как диагностический показатель состояния здоровья.

Мочевина. При усиленном распаде тканевых белков, избыточном поступлении в организм аминокислот в печени в процессе связывания токсического для организма человека аммиака (NH₃) синтезируется нетоксическое азотсодержащее вещество — мочевина. Из печени мочевина поступает в кровь и выводится с мочой.

Концентрация мочевины в норме в крови каждого взрослого человека индивидуальна — в пределах 3,5—6,5 ммоль/л. Она может увеличиваться до 7—8 ммоль/л при значительном поступлении белков с пищей, до 16—20 ммоль/л — при нарушении выделительной функции почек, а также после выполнения длительной физической работы за счет усиления катаболизма белков до 9 ммоль/л и более.

В практике спорта этот показатель широко используется при оценке переносимости спортсменом тренировочных и соревновательных физических нагрузок, хода тренировочных занятий и процессов восстановления организма. Для получения объективной информации концентрацию мочевины определяют

на следующий день после тренировки утром натошак. Если выполненная физическая нагрузка адекватна функциональным возможностям организма и произошло относительно быстрое восстановление метаболизма, то содержание мочевины в крови утром натошак возвращается к норме. Связано это с уравниванием скорости синтеза и распада белков в тканях организма, что свидетельствует о его восстановлении. Если содержание мочевины на следующее утро остается выше нормы, то это свидетельствует о недовосстановлении организма либо развитии его утомления.

Обнаружение белка в моче. У здорового человека белок в моче отсутствует. Появление его (протеинурия) отмечается при заболевании почек (нефрозы), поражении мочевых путей, а также при избыточном поступлении белков с пищей или после мышечной деятельности анаэробной направленности. Это связано с нарушением проницаемости клеточных мембран почек из-за закисления среды организма и выхода белков плазмы в мочу.

По наличию определенной концентрации белка в моче после выполнения физической работы судят о ее мощности. Так, при работе в зоне большой мощности она составляет 0,5 %, при работе в зоне субмаксимальной мощности может достигать 1,5 %.

Креатинин. Это вещество образуется в мышцах в процессе распада креатинфосфата. Суточное выделение его с мочой относительно постоянно для данного человека и зависит от мышечной массы тела. У мужчин оно составляет 18—32 мг/кг массы тела в сутки, у женщин — 10—25 мг/кг. По содержанию креатинина в моче можно косвенно оценить скорость креатинфосфокиназной реакции, а также содержание мышечной массы тела. По количеству креатинина, выделяемого с мочой, определяют содержание тощей мышечной массы тела согласно следующей формуле:

$$\text{тощая масса тела} = 0,0291 \times \text{креатинин мочи (мг/сут)} + 7,38.$$

Изменение количества тощей массы тела свидетельствует о снижении или увеличении массы тела спортсмена за счет белков. Эти данные важны в атлетической гимнастике и силовых видах спорта.

Креатин. В норме в моче взрослых людей креатин отсутствует. Обнаруживается он при перетренировке и патологических изменениях в мышцах, поэтому наличие креатина в моче может использоваться как тест при выявлении реакции организма на физические нагрузки.

В моче у детей раннего возраста креатин постоянно присутствует, что связано с преобладанием его синтеза над использованием в скелетных мышцах.

Показатели кислотно-основного состояния (КОС) организма

В процессе интенсивной мышечной деятельности в мышцах образуется большое количество молочной и пировиноградной кислот, которые диффундируют в кровь и могут вызывать метаболический ацидоз организма,

что приводит к утомлению мышц и сопровождается болями в мышцах, головокружением, тошнотой. Такие метаболические изменения связаны с истощением буферных резервов организма. Поскольку состояние буферных систем организма имеет важное значение в проявлении высокой физической работоспособности, в спортивной диагностике используются показатели КОС (таблица 4). К показателям КОС, которые в норме относительно постоянны, относятся:

- рН крови (7,35—7,45);
- рСО₂ — парциальное давление углекислого газа (Н₂СО₃ + СО₂) в крови (35—45 мм рт. ст.);
- В — стандартный бикарбонат плазмы крови НСО₂, который при полном насыщении крови кислородом составляет 22—26 мэкв/л;
- ВВ — буферные основания цельной крови либо плазмы (43— 53 мэкв/л) — показатель емкости всей буферной системы крови или плазмы;
- Л/86 — нормальные буферные основания цельной крови при физиологических значениях рН и СО₂ альвеолярного воздуха;
- ВЕ — избыток оснований, или щелочной резерв (от —2,4 до +2,3 мэкв/л) — показатель избытка или недостатка буферной емкости (ВВ - В = ВЕ).

Показатели КОС отражают не только изменения в буферных системах крови, но и состояние дыхательной и выделительной систем организма. Состояние кислотно-основного равновесия (КОР) в организме характеризуется постоянством рН крови (7,34—7,36).

Таблица 4 – Изменение кислотно-основного состояния организма.

Кислотно-основное состояние	рН мочи	Плазма НСО ₃ , ммоль/л	Плазма Н ₂ СО ₃ , ммоль/л
Норма	6—7	25	0,625
Дыхательный ацидоз	↓	↑	↑
Дыхательный алкалоз	↑	↓	↓
Метаболический ацидоз	↓	↓	↓
Метаболический алкалоз	↑	↑	↑

Примечание. Направление стрелки указывает на повышение или понижение показателей

Установлена обратная корреляционная зависимость между динамикой содержания лактата в крови и изменением рН крови. По изменению показателей КОС при мышечной деятельности можно контролировать реакцию организма на физическую нагрузку и рост тренированности спортсмена, поскольку при биохимическом контроле КОС можно определять один из этих показателей.

Наиболее информативным показателем КОС является величина ВЕ — щелочной резерв, который увеличивается с повышением квалификации спортсменов, особенно специализирующихся в скоростно-силовых видах

спорта. Большие буферные резервы организма являются серьезной предпосылкой для улучшения спортивных результатов в этих видах спорта.

Активная реакция мочи (рН) находится в прямой зависимости от кислотно-основного состояния организма. При метаболическом ацидозе кислотность мочи увеличивается до рН 5, а при метаболическом алкалозе снижается до рН 7. В таблице показана направленность изменения значений рН мочи во взаимосвязи с показателями кислотно-основного состояния.

Биологически активные вещества — регуляторы обмена веществ

Ферменты. Особый интерес в спортивной диагностике представляют тканевые ферменты, которые при различных функциональных состояниях организма поступают в кровь из скелетных мышц и других тканей. Такие ферменты называются клеточными, или индикаторными. К ним относятся альдолаза, каталаза, лактатдегидрогеназа, креатинкиназа и др. Для отдельных клеточных ферментов, например, лактатдегидрогеназы скелетных мышц, характерно наличие нескольких форм (изоферментов). Появление в крови индикаторных ферментов или их отдельных изоформ, что связано с нарушением проницаемости клеточных мембран тканей, может использоваться при биохимическом контроле за функциональным состоянием спортсмена.

В спортивной практике часто определяют наличие в крови таких тканевых ферментов процессов биологического окисления веществ, как альдолаза — фермент гликолиза и каталаза — фермент, осуществляющий восстановление перекисей водорода. Появление их в крови после физических нагрузок является показателем неадекватности физической нагрузки, развития утомления, а скорость их исчезновения свидетельствует о скорости восстановления организма.

После выполненных физических нагрузок в крови могут появляться отдельные изоформы ферментов — креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, характерные для какой-то отдельной ткани. Так, после длительных физических нагрузок в крови спортсменов появляется изоформа креатинфосфокиназы, характерная для скелетных мышц; при остром инфаркте миокарда в крови появляется изоформа креатинкиназы, характерная для сердечной мышцы. Если физическая нагрузка вызывает значительный выход ферментов в кровь из тканей, и они долго сохраняются в ней в период отдыха, то это свидетельствует о невысоком уровне тренированности спортсмена, а, возможно, и о предпатологическом состоянии организма.

Гормоны. При биохимической диагностике функционального состояния спортсмена информативными показателями является уровень гормонов в крови. Могут определяться более 20 различных гормонов, регулирующих разные звенья обмена веществ. Концентрация гормонов в крови довольно низкая и обычно варьируется в пределах от 10⁻⁸ до 10⁻¹¹ моль/л, что затрудняет широкое использование этих показателей в спортивной диагностике (Таблица 5). Основные гормоны, которые используются при оценке

функционального состояния спортсмена, а также их концентрация в крови в норме и направленность изменения при стандартной физической нагрузке представлены в таблице.

Величина изменения содержания гормонов в крови зависит от мощности и длительности выполняемых нагрузок, а также от степени тренированности спортсмена. При работе одинаковой мощности у более тренированных спортсменов наблюдаются менее значительные изменения этих показателей в крови. Кроме того, по изменению содержания гормонов в крови можно судить об адаптации организма к физическим нагрузкам, интенсивности регулируемых ими метаболических процессов, развитии процессов утомления, применении анаболических стероидов и других гормонов.

Таблица 5 – Направленность изменений концентрации гормонов в крови при физических нагрузках.

Гормон	Концентрация в крови, нг/л	Направленность изменения концентрации при физических нагрузках
Адреналин	0-0,07	↑
Инсулин	1—1,5	↓
Глюкагон	70-80	↑
Соматотропин	1-6	↑
АКТГ	10—200	↑
Кортизол	50-100	↑
Тестостерон	3—12 (мужчины) 0,1—0,3 (женщины)	↑
Эстрадиол	70-200	↓
Тироксин	50-140	↑

Витамины. Выявление витаминов в моче входит в диагностический комплекс характеристики состояния здоровья спортсменов, их физической работоспособности. В практике спорта чаще всего выявляют обеспеченность организма водорастворимыми витаминами, особенно витамином С. В моче витамины появляются при достаточном обеспечении ими организма. Данные многочисленных исследований свидетельствуют о недостаточной обеспеченности многих спортсменов витаминами, поэтому контроль их содержания в организме позволит своевременно скорректировать рацион питания или назначить дополнительную витаминизацию путем приема специальных поливитаминных комплексов.

Минеральные вещества В мышцах образуется неорганический фосфат в виде фосфорной кислоты (H_3PO_4) при реакциях перефосфорилирования в креатинфосфокиназном механизме синтеза АТФ и других процессах. По изменению его концентрации в крови можно судить о мощности креатинфосфокиназного механизма энергообеспечения у спортсменов, а также об уровне тренированности, так как прирост неорганического фосфата в крови

спортсменов высокой квалификации при выполнении анаэробной физической работы больше, чем в крови менее квалифицированных спортсменов.

Биохимический контроль развития систем энергообеспечения организма при мышечной деятельности.

Спортивный результат в определенной степени лимитируется уровнем развития механизмов энергообеспечения организма. Поэтому в практике спорта проводится контроль мощности, емкости и эффективности анаэробных и аэробных механизмов энергообразования в процессе тренировки, что можно осуществлять и по биохимическим показателям.

Для оценки мощности и емкости креатинфосфокиназного механизма энергообразования используются показатели общего алактатного кислородного долга, количество креатинфосфата и активность креатинфосфокиназы в мышцах. В тренированном организме эти показатели значительно выше, что свидетельствует о повышении возможностей креатинфосфокиназного (алактатного) механизма энергообразования.

Степень подключения креатинфосфокиназного механизма при выполнении физических нагрузок можно оценить также по увеличению в крови содержания продуктов обмена КрФ в мышцах (креатина, креатинина и неорганического фосфата) или изменению их содержания в моче.

Для характеристики гликолитического механизма энергообразования часто используют величину максимального накопления лактата в артериальной крови при максимальных физических нагрузках, а также величину общего и лактатного кислородного долга, значение рН крови и показатели КОС, содержание глюкозы в крови и гликогена в мышцах, активность ферментов лактатдегидрогеназы, фосфоорилазы и др.

О повышении возможностей гликолитического (лактатного) энергообразования у спортсменов свидетельствует более поздний выход на максимальное количество лактата в крови при предельных физических нагрузках, а также более высокий его уровень. У высококвалифицированных спортсменов, специализирующихся в скоростных видах спорта, количество лактата в крови при интенсивных физических нагрузках может возрастать до 26 ммоль/л и более, тогда как у нетренированных людей максимально переносимое количество лактата составляет 5—6 ммоль/л, а 10 ммоль/л может привести к летальному исходу при функциональной норме 1—1,5 ммоль/л. Увеличение емкости гликолиза сопровождается увеличением запасов гликогена в скелетных мышцах, особенно в быстрых волокнах, а также повышением активности гликолитических ферментов.

Для оценки мощности аэробного механизма энергообразования чаще всего используются уровень максимального потребления кислорода (МПК), время наступления ПАНО, а также показатель кислородтранспортной системы крови — концентрация гемоглобина. Повышение уровня МПК свидетельствует об увеличении мощности аэробного механизма энергообразования. Максимальное потребление кислорода у взрослых людей, не занимающихся спортом, у

мужчин составляет 3,5 л/мин, у женщин — 2,0 л/мин и зависит от массы тела. У высококвалифицированных спортсменов абсолютная величина МПК у мужчин может достигать 6—7 л/мин, у женщин — 4—5 л/мин.

По длительности работы на уровне ПАНО судят о повышении емкости механизма энергообразования. Нетренированные люди не могут выполнять физическую работу на уровне ПАНО более 5—6 мин. У спортсменов, специализирующихся на выносливость, длительность работы на уровне ПАНО может достигать 1—2 ч.

Эффективность аэробного механизма энергообразования зависит от скорости утилизации кислорода митохондриями, что связано прежде всего с активностью и количеством ферментов окислительного фосфорилирования, количеством митохондрий, а также от доли жиров при энергообразовании. Под влиянием интенсивной тренировки аэробной направленности увеличивается эффективность аэробного механизма за счет увеличения скорости окисления жиров и увеличения их роли в энергообеспечении работы.

Биохимический контроль за уровнем тренированности, утомления и восстановления организма спортсмена

Уровень тренированности в практике биохимического контроля за функциональным состоянием спортсмена оценивается по изменению концентрации лактата в крови при выполнении стандартной либо предельной физической нагрузки для данного контингента спортсменов. О более высоком уровне тренированности свидетельствуют меньшее накопление лактата (по сравнению с нетренированными) при выполнении стандартной нагрузки, что связано с увеличением доли аэробных механизмов в энергообеспечении этой работы;

- большее накопление молочной кислоты при выполнении предельной работы, что связано с увеличением емкости гликолитического механизма энергообеспечения;

- повышение ПАНО (мощность работы, при которой резко возрастает уровень лактата в крови) у тренированных лиц по сравнению с нетренированными;

- более длительная работа на уровне ПАНО;

- меньшее увеличение содержания лактата в крови при возрастании

- мощности работы, что объясняется совершенствованием анаэробных процессов и экономичностью энерготрат организма;

- увеличение скорости утилизации лактата в период восстановления после физических нагрузок.

С увеличением уровня тренированности спортсменов в видах спорта на выносливость увеличивается общая масса крови: у мужчин — от 5—6 до 7—8 л, у женщин — от 4—4,5 до 5,5—6 л, что приводит к увеличению концентрации гемоглобина до 160—180 г/л — у мужчин и до 130—150 г/л — у женщин.

Контроль за процессами утомления и восстановления, которые являются неотъемлемыми компонентами спортивной деятельности, необходим для

оценки переносимости физической нагрузки и выявления перетренированности, достаточности времени отдыха после физических нагрузок, эффективности средств повышения работоспособности, а также для решения других задач.

Утомление, вызванное физическими нагрузками максимальной и субмаксимальной мощности, взаимосвязано с истощением запасов энергетических субстратов (АТФ, КрФ, гликогена) в тканях, обеспечивающих этот вид работы, и накоплением продуктов их обмена в крови (молочной кислоты, креатина, неорганических фосфатов), поэтому и контролируется по этим показателям. При выполнении продолжительной напряженной работы развитие утомления может выявляться по длительному повышению уровня мочевины в крови после окончания работы, по изменению компонентов иммунной системы крови, а также по снижению содержания гормонов в крови и моче.

В спортивной диагностике для выявления утомления обычно определяют содержание гормонов симпато-адреналовой системы (адреналина и продуктов его обмена) в крови и моче. Эти гормоны отвечают за степень напряжения адаптационных изменений в организме. При неадекватных функциональному состоянию организма физических нагрузках наблюдается снижение уровня не только гормонов, но и предшественников их синтеза в моче, что связано с истощением биосинтетических резервов эндокринных желез и указывает на перенапряжение регуляторных функций организма, контролирующих адаптационные процессы.

Для ранней диагностики перетренированности, скрытой фазы утомления используется контроль за функциональной активностью иммунной системы. Для этого определяют количество и функциональную активность клеток Т- и В-лимфоцитов: Т-лимфоциты обеспечивают процессы клеточного иммунитета и регулируют функцию В-лимфоцитов; В-лимфоциты отвечают за процессы гуморального иммунитета, их функциональная активность определяется по количеству иммуноглобулинов в сыворотке крови.

Определение компонентов иммунной системы требует специальных условий и аппаратуры. При подключении иммунологического контроля за функциональным состоянием спортсмена необходимо знать его исходный иммунологический статус с последующим контролем в различные периоды тренировочного цикла. Такой контроль позволит предотвратить срыв адаптационных механизмов, истощение иммунной системы и развитие инфекционных заболеваний спортсменов высокой квалификации в периоды тренировки и подготовки к ответственным соревнованиям (особенно при резкой смене климатических зон).

Восстановление организма связано с возобновлением количества израсходованных во время работы энергетических субстратов и других веществ. Их восстановление, а также скорость обменных процессов происходят не одновременно. Знание времени восстановления в организме различных

энергетических субстратов играет большую роль в правильном построении тренировочного процесса. Восстановление организма оценивается по изменению количества тех метаболитов углеводного, липидного и белкового обменов в крови или моче, которые существенно изменяются под влиянием тренировочных нагрузок. Из всех показателей углеводного обмена чаще всего исследуется скорость утилизации во время отдыха молочной кислоты, а также липидного обмена — нарастание содержания жирных кислот и кетоновых тел в крови, которые в период отдыха являются главным субстратом аэробного окисления, о чем свидетельствует снижение дыхательного коэффициента. Однако наиболее информативным показателем восстановления организма после мышечной работы является продукт белкового обмена — мочевина. При мышечной деятельности усиливается катаболизм тканевых белков, способствующий повышению уровня мочевины в крови, поэтому нормализация ее содержания в крови свидетельствует о восстановлении синтеза белка в мышцах, а, следовательно, и восстановлении организма.

Контроль за применением допинга в спорте

В начале XX ст. в спорте для повышения физической работоспособности, ускорения процессов восстановления, улучшения спортивных результатов стали широко применять различные стимулирующие препараты, включающие гормональные, фармакологические и физиологические, — так называемые допинги. Использование их не только создает неравные условия при спортивной борьбе, но и причиняет вред здоровью спортсмена в результате побочного действия, а иногда являются причиной летального исхода. Регулярное применение допингов, особенно гормональных препаратов, вызывает нарушение функций многих физиологических систем:

- сердечно-сосудистой;
- эндокринной, особенно половых желез (атрофия) и гипофиза, что приводит к нарушению детородной функции, появлению мужских вторичных признаков у женщин (вирилизация) и увеличению молочных желез у мужчин (гинекомастия);
- печени, вызывая желтухи, отеки, циррозы;
- иммунной, что приводит к частым простудам, вирусным заболеваниям;
- нервной, проявляющейся в виде психических расстройств (агрессивность, депрессия, бессонница);
- прекращение роста трубчатых костей, что особенно опасно для растущего организма, и др.

Многие нарушения проявляются не сразу после использования допингов, а спустя 10—20 лет или в потомстве. Поэтому в 1967 г. МОК создал медицинскую комиссию (МК), которая определяет список запрещенных к использованию в спорте препаратов и ведет антидопинговую работу, организывает и проводит допингконтроль на наличие в организме спортсмена запрещенных препаратов. Каждый спортсмен, тренер, врач команды должен знать запрещенные к использованию препараты.

Классификация допингов.

К средствам, которые используются в спорте для повышения спортивного мастерства, относятся: допинги, допинговые методы, психологические методы, механические факторы, фармакологические средства ограниченного использования, а также пищевые добавки и вещества.

К средствам, которые причиняют особый вред здоровью и подвергаются контролю, относятся допинги и допинговые методы (манипуляции).

По фармакологическому действию допинги делятся на пять классов: 1 — психостимуляторы (амфетамин, эфедрин, фенамин, кофеин, кокаин и др.); 2 — наркотические средства (морфин, алкалоиды-опиаты, промедол, фентанил и др.); 3 — анаболические стероиды (тестостерон и его производные, метандростенолон, ретаболил, андродиол и многие другие), а также анаболические пептидные гормоны (соматотропин, гонадо-тропин, эритропоэтин); 4 — бета-блокаторы (анапримин (пропранолол), окспренолол, надолол, атенолол и др.); 5 — диуретики (новурит, дихлоти-азид, фуросемид (лазикс), клопамид, диакарб, верошпирон и др.).

Допинги являются биологически активными веществами, выделенными из тканей животных или растений, получены синтетически, как и их аналоги. Многие допинги входят в состав лекарств от простуды, гриппа и других заболеваний, поэтому прием спортсменом лекарств должен согласовываться со спортивным врачом во избежание неприятностей при допингконтроле.

К допинговым методам относятся кровяной допинг, различные манипуляции (например, подавление процесса овуляции у женщин и др.).

Биологическое действие в организме отдельных классов допингов разнообразно. Так, психостимуляторы повышают спортивную деятельность путем активации деятельности ЦНС, сердечно-сосудистой и дыхательной систем, что улучшает энергетику и сократительную активность скелетных мышц, а также снимают усталость, придают уверенность в своих силах, однако могут привести к предельному напряжению функций этих систем и истощению энергетических ресурсов. Наркотические вещества подавляют болевую чувствительность, так как являются сильными анальгетиками, и отдалают чувство утомления. Анаболические стероиды усиливают процессы синтеза белка и уменьшают их распад, поэтому стимулируют рост мышц, количества эритроцитов, способствуя ускорению адаптации организма к мышечной деятельности и процессов восстановления, улучшению композиционного состава тела. Бета-блокаторы противодействуют эффектам адреналина и норадреналина, что как бы успокаивает спортсмена, повышает адаптацию к физическим нагрузкам на выносливость. Диуретики, или мочегонные средства усиливают выведение из организма солей, воды и некоторых химических веществ, что способствует снижению массы тела, выведению запрещенных препаратов.

Следует отметить, что среди рассмотренных классов допинга наиболее часто применяются анаболические стероиды. В тяжелой атлетике,

пауэрлифтинге, бодибилдинге их применяют около 90 % мужчин и 20 % женщин. В других видах спорта они используются в меньшей степени (78 % — футболисты, 40 % — спринтеры). При этом используемые дозы могут многократно превышать рекомендуемые (5—10 мг) и достигать 300 мг и даже 2 г.

Задачи, объекты и методы допингконтроля.

Задачей допингконтроля является выявление возможного использования допинговых веществ и допинговых методов спортсменами на соревнованиях и в процессе тренировки, применение к виновным специальных санкций.

Допингконтроль проводится во время Олимпийских игр, чемпионатов мира и Европы, а в последнее время — и на менее крупных соревнованиях либо даже в период тренировки (по решению международных спортивных организаций). Назначается допинговый контроль медицинской комиссией МОК или НОК, а проводится аккредитованными МОК специальными лабораториями, обычно той страны, в которой проводятся соревнования. Допинглаборатории существуют при биохимических или других институтах, оснащенных современной аппаратурой.

В последнее время в качестве основного объекта контроля используется проба мочи, поскольку это неинвазивный объект и собрать можно неограниченный объем. Образец мочи должен составлять не менее 100 мл с рН 6,5. Забор мочи производят в присутствии эксперта МК МОК. Собранная проба делится на две части и на холоду доставляется в центр допингового контроля.

С целью обнаружения применения кровяного допинга используют образцы венозной крови.

Для выявления допинговых веществ в моче или крови спортсмена применяются высокочувствительные методы биохимического анализа, так как концентрация этих веществ незначительна. К таким методам относятся: газовая хроматография, масс-спектрометрия, жидкостная хроматография, флюоресцентный иммунный анализ. При этом следует использовать не менее двух методов.

Хотя методы допингконтроля высокочувствительны, в настоящее время затруднения вызывает выявление анаболических пептидных гормонов (соматотропина, эритропоэтина и др.), а также применение кровяного допинга.

1.12. Биохимические подходы в фармацевтике.

Перспективы развития фармацевтической технологии тесно связаны с влиянием научно-технического прогресса. На базе новейших научных открытий создаются принципиально новые, более совершенные и производительные технологические процессы, резко увеличивающие производительность труда и повышающие качество готовой продукции.

Технология оказывает значительное влияние на будущие экономические показатели производства, требует разработки малооперационных, ресурсосберегающих и безотходных процессов, их максимальной механизации, автоматизации и компьютеризации.

Для прогнозирования и оптимизации технологических процессов успешно применяется математическое планирование эксперимента, прочно вошедшее в технологическую науку и практику. Этот метод позволяет получать математические модели, связывающие параметр оптимизации с влияющими на него факторами, и дает возможность без длительного процесса выявлять их оптимальные технологические режимы.

Таким образом, технологии получили новые современные методы определения оптимальных конечных результатов с наименьшими затратами, что является наглядным примером того, как наука превращается в непосредственную производительную силу.

В результате возросшей роли и возможностей технологии необычно сокращаются сроки от возникновения идеи, первых результатов научных исследований до их реализации в промышленном производстве.

Перспективы развития фармацевтической технологии определяются требованиями современной фармакотерапии, которые предполагают создание максимально эффективных с лечебной точки зрения лекарственных препаратов при содержании в них минимума лекарственных субстанций, не обладающих побочными действиями. В основе решения этой задачи лежат положения и принципы биофармации, базирующиеся на оптимальном подборе состава и вида лекарственной формы и использовании оптимальных технологических процессов. Этим объясняется широкое распространение и углубление биофармацевтических исследований во многих странах.

Однако изучение биофармацевтических аспектов получения и назначения лекарственных препаратов, изучение "судьбы" лекарственных средств в организме — это лишь первый этап решения сформулированной выше задачи. Дальнейшие усилия должны быть направлены на реализацию полученных сведений в процессе производства и применения лекарственных препаратов с целью ликвидации таких их недостатков, как короткий срок действия; неравномерное поступление лекарственных веществ в патологический очаг; отсутствие избирательного действия; недостаточная стабильность и др.

Лишь те лекарства могут считаться рациональными, которые обеспечивают оптимальную биологическую доступность действующих

веществ. Следовательно, к современным лекарствам могут относиться и традиционные, например, таблетки, мази, суппозитории и др., если они обеспечивают рациональную фармакотерапию.

К первоочередным задачам фармацевтической технологии следует отнести повышение растворимости труднорастворимых лекарственных веществ в воде и липидах; увеличение стабильности гомогенных и гетерогенных лекарственных систем; продление времени действия лекарственных препаратов; создание лекарств направленного действия с заданными фармакологическими свойствами.

Совершенствование регулируемости и направленности действия биологически активных веществ является основным направлением в развитии фармацевтической технологии. Разработанные лекарственные системы с регулируемым высвобождением действующих веществ позволяют быстро достичь лечебного эффекта, длительно удерживать постоянный уровень их терапевтической концентрации в плазме крови. Как показала практика, использование таких лекарственных систем дает возможность уменьшить курсовую дозу, устранить раздражающее действие и передозировку лекарственных веществ, уменьшить частоту проявлений побочных эффектов.

Особого внимания заслуживают так называемые терапевтические системы для перорального и трансдермального применения, номенклатура которых во многих странах с каждым годом расширяется.

Наиболее перспективны в области современной фармакотерапии терапевтические системы с направленной доставкой лекарственных веществ к органам, тканям или клеткам. Направленная доставка позволяет значительно снизить токсичность лекарственных веществ и экономно их расходовать. Около 90% лекарственных веществ, применяемых в настоящее время, не достигает цели, что свидетельствует об актуальности данного направления в фармацевтической технологии.

Терапевтические системы с направленной доставкой лекарственных веществ принято подразделять на три группы:

- носители лекарственных веществ первого поколения (микрокапсулы, микросферы) предназначены для внутрисосудистого введения вблизи определенного органа или ткани;

- носители лекарственных веществ второго поколения (нанокапсулы, липосомы) размером менее 1 мкм объединяются в одну группу под названием коллоидных носителей. Они распределяются преимущественно в селезенке и печени — тканях, богатых клет-

- коми ретикуло-эндотелиальной системы. Разработаны методы получения нанокапсул с фенobarбиталом, diazepamом, prednisolonom, инсулином, простагландинами; наносфер с цитостатиками, кортикостероидами; изучаются липосомы для доставки ферментов, хелатирующих и химиотерапевтических, противовоспалительных, противовирусных и белковой природы (инсулина) веществ;

- носители лекарственных веществ третьего поколения (антитела, гликопротеиды) открывают новые возможности обеспечения высокого уровня избирательного действия и направленной их доставки.

Для транспорта и локальной доставки лекарственных веществ к органу мишени могут быть использованы магнитоуправляемые системы. Создавая в органе депо лекарственного вещества, они могут пролонгировать его действие.

Создание, доклиническое изучение и доклинические испытания лекарств.

Основной источник получения лекарств из растительного, животного и минерального сырья, существовавший с древних времен, в середине XIX века вытесняется лекарственными субстанциями, полученными с помощью химического синтеза, существующего по сегодняшний день. В начале XX века приобрел распространение способ получения субстанций в виде антитоксических, антимикробных сывороток и профилактических вакцин. В 40-х годах была разработана технология антибиотиков и сульфаниламидов. 70-е годы ознаменовались развитием биотехнологии, которая, стремительно развиваясь, в настоящее время выдвинулась на передний край научно-технического прогресса.

За последние 20 лет значительно расширились возможности и эффективность лекарственной терапии, что обусловлено созданием и внедрением в медицинскую практику большого количества новых лекарственных средств и, в первую очередь таких высокоэффективных, как антибиотики и сульфаниламиды нового поколения, а также психотропные, гипотензивные, противодиабетические и др. Номенклатура лекарств, применяющихся в медицинской практике, обновилась на 60-80% и насчитывает свыше 40 тыс. наименований индивидуальных и комбинированных составов. Этому способствовали прежде всего фундаментальные успехи химических, фармацевтических, медико-биологических и других смежных наук, обеспечивших дальнейшее развитие фармацевтической отрасли.

Пути поиска и разработки новых лекарственных средств (препаратов).

Создание новых лекарственных субстанций и препаратов — процесс весьма трудоемкий и дорогостоящий, в котором участвуют представители многих профессий: химики, фармацевты, фармакологи, токсикологи, врачи-клиницисты, биологи и др. Эти совместные усилия специалистов не всегда завершаются успешно. Так, из 7 тысяч синтезированных соединений только одно становится лекарственным средством.

Для поиска новых синтетических лекарственных субстанций или субстанций из лекарственного растительного сырья еще не разработаны устойчивые теории.

Общепринятым каноническим направлением поиска синтезированных лекарственных средств является установление связей между фармакологическим действием и структурой с учетом их физико-химических

свойств. В настоящее время поиск новых лекарственных средств (по А.Н.Кудрину) ведется по следующим направлениям.

Эмпирическое изучение БАВ основано на представлении, что многие вещества обладают определенной фармакологической активностью. В основе этого изучения лежит метод "проб и ошибок", с помощью которого фармаколог определяет принадлежность полученных веществ к той или иной фармакотерапевтической группе. Затем среди них отбираются наиболее активные вещества и устанавливается степень их специфической активности и токсичности по сравнению с существующими лекарственными средствами — аналогами по действию. Такой путь отбора фармакологически активных веществ получил название скрининга. Это весьма дорогой и трудоемкий метод, так как приходится иметь дело с большим количеством различных биологически активных веществ.

Объем первичных исследований изучаемого вещества зависит от его природы. Если оно является производным известного ряда соединений, то, как правило, ограничиваются лишь сравнительным изучением его специфического действия. Если вещество оригинальное, то планируется целенаправленное всестороннее его изучение. Рассматривается такое соединение как потенциальное лекарственное вещество. Уже на начальной стадии планирования в исследования включают изучение химических и физических свойств, разработку методов стандартизации и контроля за его качеством. Последующие экспериментальные исследования должны проводиться только с сериями вещества, полученного по технологии, обеспечивающей его стандартные качественные и количественные характеристики.

Модификация структур существующих лекарственных средств — весьма распространенное направление. Химики заменяют в существующем соединении один радикал другим, например, метальный этильным, пропильным и другими алкильными радикалами с более высокой молекулярной массой или, наоборот, вводят в состав исходной молекулы новые химические элементы, в частности галогены, нитрогруппы, или производят иные модификации основной структуры. Этот путь позволяет изменить структуру молекулы вещества, что приводит к изменению его активности, уменьшению отрицательных свойств и токсичности, придает совершенно новую направленность терапевтическому действию.

По мере развития науки стало совершенно очевидным, что оптимальный поиск новых лекарственных средств должен базироваться на выявлении БАВ, участвующих в процессах жизнедеятельности, на раскрытии патофизиологических и патохимических процессов, лежащих в основе патогенеза различных заболеваний, а также на углубленном изучении механизмов фармакологического эффекта. В подходах к скрининговым исследованиям должен лежать не метод случайных наблюдений, а направленный синтез веществ с улучшенными свойствами и предполагаемой активностью.

Целенаправленный синтез лекарственных веществ означает поиск веществ с заранее заданными фармакологическими свойствами. Синтез новых структур с предполагаемой активностью чаще всего проводится в том классе химических соединений, где уже найдены вещества, обладающие определенной направленностью действия в нужном для исследователя аспекте. Целенаправленный синтез веществ труднее осуществлять в новых химических классах соединений ввиду отсутствия необходимых первоначальных сведений о связи фармакологической активности со структурой вещества. Далее в избранное основное вещество вводят различные радикалы. Очень важно получить вещество, растворимое в воде и жирах, чтобы оно могло всосаться в кровь, перейти из нее через гематотканевые барьеры в органы и затем вступить в связь с клеточными мембранами или проникнуть через них внутрь клетки и соединиться с биомолекулами представлены наиболее часто встречающиеся в лекарственных веществах радикалы и их сродство к воде и липидам. С помощью указанных и аналогичных им радикалов можно повысить лечебную активность липотропных веществ. Например, введение фтора в молекулу психотропных средств фенотиазинового ряда и в молекулу глюкокортикоидных гормонов существенно повышает их активность. Поиск новых биологически активных веществ дает удовлетворительные результаты при синтезе антагонистов тех веществ, которые участвуют в жизнедеятельности организма (медиаторы, витамины, гормоны) или являются незаменимыми участниками биохимических процессов (субстраты ферментов, коферменты и др.).

При синтезе новых лекарственных веществ их фармакологическая активность определяется не только размерами и формой молекулы, но и в значительной степени стереохимическими факторами, которые влияют на положение молекул в пространстве. Например, трансамин (транилципромин) оказывает антидепрессивное действие с возбуждающим эффектом. Его геометрический изомер — цис-амин сохраняет антидепрессивное действие, но при этом у него исчезает возбуждающий эффект и появляется противоположный ему транквилизирующий компонент действия, являющийся весьма ценным в практическом отношении.

У изомеров может изменяться не только фармакологическая активность, но и токсичность. Токсичность цис-амин по показателю LD₅₀ (на мышах) в 6 раз меньше, чем у транс-амин, поэтому при целенаправленном синтезе нового лекарственного вещества возникает необходимость изучения его изомеров.

Рандомизированный скрининг позволяет получить принципиально новые синтетические или природного происхождения вещества на основании скринингового исследования на животных с помощью набора тестов по изучению эффективности и безопасности новых соединений. В последнее время с помощью этого сложного скринингового исследования в медицинскую практику были внедрены психотропное средство антидепрессант — пиразидол, противовирусный препарат — арбидол и др.

Велика значимость в медицинской практике лекарственных субстанций, полученных из растительного сырья, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с синтетическими веществами (более мягкое, часто пролонгированное действие); они, как правило, не вызывают аллергических осложнений.

Ход и содержание эксперимента (поиск, изучение и постановка на производство) с новым лекарственным средством, выделенным из растительного сырья, могут быть определены стандартом предприятия.

Следует отметить, что поиск оригинальных лекарственных субстанций не всегда экономически выгоден, особенно для слаборазвитых стран, поскольку требует больших затрат на доведение их до производства, а высокая стоимость лекарств, изготовленных на основе этих субстанций, делает их недоступными для потребителя. Поэтому многие фармацевтические фирмы для создания лекарственных препаратов используют импортные субстанции, хорошо себя зарекомендовавшие в медицинской практике и время патентной защиты которых истекло. Эти препараты называют генериками (*ge-nerics*). Примером такого подхода может быть производство септри-ма (английской фирмы "Welcome") и бисептола (польской фирмы "Polfa") на базе сульфаметоксазола (0,4 г) и триметоприма (0,08 г). Такой путь создания лекарств позволяет быстрее насытить ими рынок, значительно снизить экономические затраты на их создание, улучшив качество за счет более оптимального подбора вспомогательных веществ и технологических приемов.

Необходимо отметить, что стоимость препаратов-генериков иногда составляет 20-60% от стоимости аналогичных импортных лекарств.

Выявление новых свойств у лекарственных препаратов, уже применяющихся в клинике, путем тщательного наблюдения за их действием на различные системы организма. Таким образом было установлено гипотензивное свойство р-адреноблокаторов, противотромбическая активность ацетилсалициловой кислоты.

Составление композиций комбинированных препаратов — один из путей поиска новых лекарств. Принципы, на основе которых создаются эти лекарства, могут быть различными.

Чаще всего в комбинированные препараты включают лекарственные вещества, оказывающие адекватное действие на причину заболевания и основные звенья патогенеза болезни. В комбинированный препарат обычно включают лекарственные вещества в малых или средних дозах, когда между ними существуют явления синергизма — взаимного усиления действия в виде потенцирования или суммирования. Комбинированные препараты интересны тем, что принципы синергизма, на основе которых они созданы, позволяют добиться лечебного эффекта при отсутствии или минимуме отрицательных явлений. Кроме того, введение малых доз лекарственных веществ не нарушает естественных защитных или компенсаторных механизмов, развивающихся в организме в ответ на болезнь. К средствам, подавляющим отдельные звенья

патологии, желательно добавлять лекарственные вещества, стимулирующие защитные силы организма.

В комбинированные препараты, регулирующие деятельность центральной нервной системы, необходимо включать вещества, соответственно влияющие на деятельность исполнительных органов — сердце, сосуды, почки и др.

Комбинированные препараты противомикробного действия состоят из таких ингредиентов, каждый из которых повреждает разные системы размножения и жизнеобеспечения микробов.

В комбинированные препараты очень часто включаются дополнительные ингредиенты, которые усиливают (расширяют) эффективность основного вещества или устраняют его отрицательное действие. Так, комбинированный препарат "Солпадеин R", содержащий парацетамол и кодеин, обеспечивает более выраженный анальгизирующий эффект по сравнению с используемыми субстанциями, взятыми отдельно, поскольку болевые импульсы "перекрываются" на всем протяжении от периферии до центра и наоборот (кодеин оказывает центральное действие, а парацетамол наряду с этим — периферическое). Кроме того, такое сочетание двух субстанций позволяет уменьшить их дозу, сохранив продолжительность и эффективность действия.

Для профилактики и лечения многих заболеваний, а также для повышения сопротивляемости организма к инфекциям и во многих других случаях используются поливитаминные препараты, часто содержащие микроэлементы. Их составы формируются с учетом назначения: поливитамины общего назначения ("Альвитил", "Вит-рум", "Дуовит", "Мегавит", "Мульти-табс", "Олиговит", "Супра-дин", "Юникап Ю" и др.); для профилактики заболеваний нервной и сердечно-сосудистой системы ("Биовиталь", "Мультивитамины плюс", "Желе Роял"); для профилактики кариеса ("Ви-Дайлин Ф", "Ви-Дайлин Ф-АДС с железом", "Витафтор"); для профилактики онкозаболеваний ("Детский антиоксидант", "Супрантиоксидант", "Триовит"); для применения в период беременности ("Гравинова", "Матерна", "Поливит нова вита", "Прегнавит"). Они имеют различные лекарственные формы (таблетки, таблетки шипучие, драже, сиропы, капли, капсулы, растворы и т.д.), различный режим дозирования и условия применения.

Широкий ассортимент комбинированных витаминных составов позволяет осуществить индивидуальный подбор лекарств для каждого конкретного случая.

Экспериментальное изучение и клинические испытания лекарств.

Реализация жесткого требования современной фармакотерапии — минимальной дозой лекарства обеспечить оптимальный терапевтический эффект без побочных явлений — возможна лишь при тщательном изучении новых лекарственных препаратов на доклиническом и клиническом этапах.

Доклиническое (экспериментальное) изучение биологически активных веществ принято условно подразделять на фармакологическое и токсикологическое. Эти исследования взаимосвязаны и строятся на одних и

тех же научных принципах. Результаты изучения острой токсичности потенциального фармакологического вещества дают информацию для проведения последующих фармакологических исследований, которые в свою очередь определяют степень и продолжительность изучения хронической токсичности вещества.

Целью фармакологических исследований является определение терапевтической эффективности исследуемого продукта — будущего лекарственного вещества, его влияния на основные системы организма, а также установление возможных побочных эффектов, связанных с фармакологической активностью.

Очень важно установить механизм действия фармакологического средства, а при наличии — и не основных видов действия, а также возможное взаимодействие с другими лекарственными средствами.

Фармакологические исследования проводятся на моделях соответствующих заболеваний или патологических состояний с применением однократно вводимых, постоянно возрастающих доз веществ с целью поиска необходимого эффекта. Данные начальных фармакологических исследований уже могут дать некоторые представления о токсичности вещества, которые должны быть углублены и расширены при специальных исследованиях.

При токсикологических исследованиях фармакологического средства устанавливается характер и выраженность возможного повреждающего воздействия на организм экспериментальных животных. Выделяются четыре этапа исследований.

1. Изучение основного вида фармакологической активности на нескольких экспериментальных моделях у животных, а также установление фармакодинамики лекарственного средства.

2. Изучение острой токсичности средства при однократном применении (введении) проводят с целью определения наличия побочных реакций при однократном приеме увеличенной дозы и установлении причин летальности; широты терапевтического действия или терапевтического индекса Эрлиха (отношение максимально переносимой дозы к максимальной терапевтической), что невозможно установить в клинических условиях. При изучении острой токсичности определяют показатель DL_{50} для различных видов животных и рассчитывают коэффициент видовой чувствительности по отношению DL_{50max}/DE_{50min} . Если этот коэффициент равен 1 или близок к ней, то это свидетельствует об отсутствии видовой чувствительности. Если же коэффициент значительно отличается от единицы, это указывает на различную выраженность токсического действия фармакологического средства на разные виды млекопитающих, что необходимо учитывать при пересчете экспериментальной эффективной дозы для человека.

3. Определение хронической токсичности соединения, которое включает в себя повторные введения фармакологического средства на протяжении определенного времени в зависимости от предполагаемого курса его

применения в клинике. Исследуемое средство обычно вводят ежедневно в трех дозах: близкой к терапевтической, предполагаемой терапевтической и максимальной с целью выявления токсичности. Во время эксперимента определяется объем потребления животными корма и воды, динамика их массы, изменение общего состояния и поведения (реакций); проводятся гематологические и биохимические исследования. По окончании эксперимента животных забивают и проводят патоморфологические исследования внутренних органов, мозга, костей, глаз.

4. Установление специфической токсичности фармакологического средства (канцерогенноеTM, мутагенности, эмбриотоксичности, гонадотоксичности, аллергизирующих свойств, а также способности вызывать лекарственную зависимость, иммунотоксического действия).

Выявление повреждающего действия испытуемого средства на организм экспериментальных животных дает исследователям информацию о том, какие органы и ткани наиболее чувствительны к потенциальному лекарственному средству и на что следует обратить особое внимание при проведении клинических испытаний.

Исследование новых фармакологических средств на животных основывается на данных о существовании определенной корреляции между влиянием этих соединений на животных и человека, физиологические и биохимические процессы которых во многом сходны. В связи с тем, что между животными имеются существенные видовые различия в интенсивности обмена веществ, активности ферментных систем, чувствительных рецепторов и т.д., исследования проводят на нескольких видах животных, включая кошек, собак, обезьян, которые в филогенетическом отношении стоят ближе к человеку.

Следует отметить, что аналогичная схема проведения лабораторных (экспериментальных) исследований приемлема как для простого, так и для сложного лекарственного препарата, в эксперименте с которым планируются обязательные дополнительные биофармацевтические исследования, подтверждающие оптимальный выбор вида лекарственной формы и ее состава.

Экспериментальное доклиническое изучение нового средства (его фармацевтических, фармакологических и токсикологических свойств) проводится по стандартным унифицированным методикам, которые обычно описываются в методических рекомендациях Фармакологического комитета, и должно отвечать требованиям Good Laboratory Practice (GLP) — Надлежащей лабораторной практики (НЛП).

Доклинические исследования фармакологических веществ позволяют разработать схему рациональных испытаний лекарственных препаратов в условиях клиники, повысить их безопасность. Несмотря на большую значимость доклинических исследований новых веществ (препаратов), окончательное суждение об их эффективности и переносимости складывается только после проведения клинических испытаний, а нередко, и после определенного периода их широкого применения в медицинской практике.

Клинические испытания новых лекарственных средств и препаратов должны проводиться с максимальным соблюдением требований международного стандарта "Надлежащая клиническая практика" (Good Clinical Practice (GCP)), который регламентирует планирование, проведение (дизайн), мониторинг, длительность, аудит, анализ, отчетность и ведение документации исследования.

При проведении клинических испытаний лекарственных препаратов используются специальные термины, в содержание которых вкладывается определенный смысл. Рассмотрим основные термины, принятые GCP.

Клинические испытания — систематическое изучение исследуемого препарата на людях в целях проверки его лечебного действия или выявления нежелательной реакции, а также изучение всасывания, распределения, метаболизма и выведения из организма для определения его эффективности и безопасности.

Исследуемый продукт — фармацевтическая форма активного вещества или плацебо, изучаемого или используемого для сравнения в клиническом испытании.

Спонсор (заказчик) — физическое или юридическое лицо, которое принимает на себя ответственность за инициативу, управление и/или финансирование клинических испытаний.

Исследователь — лицо, ответственное за проведение клинического испытания.

Субъект испытания — лицо, участвующее в клинических испытаниях исследуемого продукта.

Гарантия качества клинических испытаний — комплекс мер, обеспечивающих соответствие проводимых испытаний требованиям GCP, основанных на нормах общей и профессиональной этики, стандартных операционных процедурах и отчетности.

Для проведения клинических испытаний заводом-изготовителем нарабатывается определенное количество препарата, контролируется его качество в соответствии с требованиями, заложенными в проекте ВФС, затем он фасуется, маркируется (указывается "Для клинических испытаний") и направляется в медицинские учреждения. Одновременно с лекарственным препаратом в адрес клинических баз направляется следующая документация: представление, решение ГНЭЦЛС, программа клинических испытаний и др.

Решение о проведении клинических испытаний с правовой точки зрения и их оправданность в этическом отношении основывается на оценке экспериментальных данных, полученных в опытах на животных. Результаты экспериментальных, фармакологических и токсикологических исследований должны убедительно свидетельствовать о целесообразности проведения испытаний нового лекарственного препарата на людях.

В соответствии с существующим законодательством клинические испытания нового лекарственного препарата проводятся на больных,

страдающих теми заболеваниями, для лечения которых предназначено данное лекарство.

Министерством здравоохранения утверждены методические рекомендации по клиническому изучению новых лекарств, относящихся к различным фармакологическим категориям. Они разрабатываются ведущими учеными медицинских учреждений, обсуждаются и утверждаются Президиумом ГНЭЦЛС. Применение этих рекомендаций гарантирует безопасность больных и способствует повышению уровня клинических испытаний.

Любое исследование на человеке должно быть хорошо организовано и проводиться под контролем специалистов. Неправильно проведенные испытания признаются неэтичными. В связи с этим большое внимание уделяется планированию клинических испытаний.

Для того чтобы в работе врачей не проявлялись узкопрофессиональные интересы, которые не всегда отвечают интересам больного и общества, а также с целью обеспечения прав человека, во многих странах мира (США, Великобритания, Германия и др.) созданы специальные этические комитеты, призванные контролировать научные исследования лекарств на людях. Этический комитет создан и в Украине.

Приняты международные акты об этических аспектах проведения медицинских исследований на людях, например, Нюрнбергский кодекс (1947), в котором отражены вопросы защиты интересов человека, в частности, неприкосновенности его здоровья, а также Хельсинская декларация (1964), содержащая рекомендации для врачей по биомедицинским исследованиям на людях. Изложенные в них положения носят рекомендательный характер и в то же время не освобождают от уголовной, гражданской и моральной ответственности, предусмотренной законодательствами этих стран.

Медико-правовые основы этой системы гарантируют как безопасность и своевременное адекватное лечение больных, так и обеспечение общества наиболее эффективными и безопасными лекарствами. Только на основе официальных испытаний, методически верно спланированных, объективно оценивающих состояние больных, а также научно проанализированных экспериментальных данных можно сделать правильные выводы о свойствах новых лекарств.

Программы клинических испытаний для различных фармакотерапевтических групп лекарственных препаратов могут значительно отличаться. Однако имеется ряд основных положений, которые всегда отражаются в программе: четкая формулировка целей и задач испытания; определение критериев выбора для испытаний; указание методов распределения больных в испытываемую и контрольную группы; число больных в каждой группе; метод установления эффективных доз лекарственного препарата; длительность и метод проведения испытания контролируемого препарата; указание препарата сравнения и/или плацебо; методы количественной оценки действия используемого препарата (подлежащие

регистрации показатели); методы статистической обработки полученных результатов

Программа клинических испытаний проходит обязательную экспертизу в комиссии по вопросам этики.

Участвующие в испытании нового препарата пациенты (добровольцы) должны получить информацию о сути и возможных последствиях испытаний, ожидаемой эффективности лекарства, степени риска, заключить договор о страховании жизни и здоровья в порядке, предусмотренном законодательством, а во время испытаний находиться под постоянным наблюдением квалифицированного персонала. В случае возникновения угрозы здоровью или жизни пациента, а также по желанию пациента или его законного представителя, руководитель клинических испытаний обязан приостановить испытания. Кроме того, клинические испытания приостанавливаются в случае отсутствия или недостаточной эффективности лекарства, а также нарушения этических норм.

Клиническая апробация генерических препаратов проводится по программе "Ограниченные клинические испытания" по установлению их биоэквивалентности.

В процессе клинических испытаний лекарства выделяют четыре взаимосвязанные фазы: 1 и 2 — дорегистрационные; 3 и 4 — пострегистрационные.

Первая фаза исследования проводится на ограниченном числе больных (20-50 человек). Цель — установление переносимости лекарственного препарата.

Вторая фаза — на 60-300 больных при наличии основной и контрольной групп и использовании одного или нескольких препаратов сравнения (эталонных), желательно с одинаковым механизмом действия. Цель — проведение контролируемого терапевтического (пилотного) исследования препарата (определение диапазонов: доза — режим применения и, если возможно, доза — эффект) для оптимального обеспечения дальнейших испытаний. Критериями оценки обычно служат клинические, лабораторные и инструментальные показатели.

Третья фаза — на 250-1000 человек и более. Цель — установить краткосрочный и долгосрочный баланс безопасности — эффективность лекарственного препарата, определить его общую и относительную терапевтическую ценность; изучить характер встречающихся побочных реакций, факторы, изменяющие его действие (взаимодействие с другими лекарственными препаратами и др.). Испытания должны быть максимально приближенными к предполагаемым условиям использования данного лекарственного препарата.

Результаты клинического испытания заносятся в индивидуальную стандартную карту каждого больного. В конце испытания полученные результаты суммируются, обрабатываются статистически и оформляются в

виде отчета (в соответствии с требованиями ГНЭЦЛС), который заканчивается аргументированными выводами.

Отчет о клинических испытаниях лекарственного препарата направляется в ГНЭЦЛС, где подвергается тщательной экспертизе. Конечным результатом экспертизы всех поступивших в ГНЭЦЛС материалов является инструкция по применению лекарственного препарата, регламентирующая его применение в клинических условиях.

Лекарственный препарат может быть рекомендован к клиническому применению в том случае, если он эффективнее известных лекарств аналогичного типа действия; обладает лучшей переносимостью по сравнению с известными препаратами (при одинаковой эффективности); эффективен при состояниях, когда применение имеющихся лекарств безуспешно; экономически более выгоден, имеет более простую методику применения или более удобную лекарственную форму; при комбинированной терапии повышает эффективность уже существующих лекарств, не увеличивая их токсичности.

Четвертая фаза (постмаркетинговая) исследований проводится на 2000 и более человек после разрешения лекарственного препарата к медицинскому применению и промышленному производству (после поступления лекарства в аптеку). Основная цель — сбор и анализ информации о побочных эффектах, оценка терапевтической ценности и стратегии назначения нового лекарственного препарата. Исследования в четвертой фазе осуществляются на основе информации в инструкции по применению препарата.

При проведении клинических испытаний новых лекарственных препаратов важнейшей задачей является обеспечение их качества. Для достижения этой цели осуществляется мониторинг, аудит и инспекция клинических испытаний.

Мониторинг — деятельность по контролю, наблюдению и проверке клинического испытания, осуществляемая монитором. Монитор является доверенным лицом организатора клинических испытаний (спонсора), на которого возлагается обязанность непосредственно контролировать ход исследования (соответствие полученных данных данным протокола, соблюдение этических норм и др.), оказывать помощь исследователю в проведении испытания, обеспечивать его связь со спонсором.

Аудит — независимая проверка клинического испытания, которая проводится службами или лицами, не участвующими в нем.

Аудит может проводиться также представителями государственных органов, отвечающих за регистрацию лекарственных препаратов в стране. В этих случаях аудит называется инспекцией.

Работая параллельно для достижения единой цели, монитор, аудиторы и официальные инспекции обеспечивают необходимое качество клинических испытаний.

При проведении клинических испытаний с участием большого количества пациентов возникает необходимость в оперативной обработке результатов исследования. С этой целью корпорацией "Pfizer" разработаны новые методы

информатики (компьютерная программа "Q-NET" для обработки базы данных, полученных при исследовании препарата "Viagra"), позволяющие ознакомиться в течение суток с результатами клинических испытаний с участием 1450 пациентов, которые проводятся в 155 клинических центрах, находящихся в различных странах. Создание таких программ позволяет сократить до минимума время продвижения новых препаратов на этапе клинических испытаний.

Таким образом, эффективность и безопасность лекарств гарантируется: испытаниями в условиях клиники;

- постмаркетинговыми клиническими исследованиями при широком медицинском применении лекарств;

- тщательной экспертизой результатов на всех указанных выше этапах.

Наличие комплексной оценки эффективности и безопасности лекарств и экстраполяции результатов на трех этапах позволяет выявить механизмы возможного побочного действия, уровня токсичности лекарства, а также разработать наиболее оптимальные схемы его применения.

Вырисовывается перспектива комплексного подхода, основанного на оптимальном сочетании принципов биофармации, новейших достижений химических и фармацевтических технологий, с широким привлечением клинического опыта к созданию и производству новых лекарственных препаратов. Такой подход к этой проблеме является качественно новым в фармацевтической практике и, очевидно, позволит раскрыть новые возможности в сложном процессе создания и использования лекарственных препаратов.

Пути совершенствования традиционных лекарств

При разработке новых лекарственных средств с уже известным действием предпринимаются попытки увеличить их специфичность. Так, сальбутанол — одно из новых бронхорасширяющих средств — стимулирует β -адренорецепторы в дозах, которые оказывают незначительное действие на адренергические рецепторы сердца. Преднизолон является более ценным стероидом, чем кортизон, так как при одинаковом противовоспалительном эффекте он в меньшей степени задерживает соли в организме.

С целью преодоления таких нежелательных свойств лекарственных веществ, как горький или кислый вкус, неприятный запах, раздражающее действие желудочно-кишечного тракта, боль при инъекциях, незначительная абсорбция, медленный или быстрый процессы метаболизма, нестабильность и другие, в фармакотерапии используются различные модификации лекарственных веществ (биологическая, физико-химическая, химическая). Для того чтобы показать наличие изменения структуры лекарственного вещества, введен термин "пролекарство", который обозначает химическую модификацию субстанции. В организме это новое соединение подвергается ферментации и высвобождается в виде его немодифицированной формы. В настоящее время за рубежом выпускается более 100 наименований лекарственных препаратов,

содержащих антибиотики, стероидные гормоны, простагландины в виде пролекарств.

Особого внимания заслуживают так называемые комбинированные лекарственные препараты, в которых сочетание составных компонентов осуществляется на базе обоснованного научного эксперимента.

Поскольку патогенез (причина возникновения и развития болезненного процесса в организме) вирусных респираторных инфекций представляет собой сложный комплексный процесс, затрагивающий разные участки верхних дыхательных путей, то и противостудные препараты должны быть комплексными и обладать полифармакоте-рапевтическими эффектами. Другими словами, в комплексный препарат должны входить вещества, действующие на различные звенья патогенетической цепи и устранять основные симптомы простудных заболеваний.

Таблетки "Колдрекса" состоят из 500 мг парацетамола, 5 мг фенилэфрина гидрохлорида (метазона), 25 мг кофеина, 20 мг тер-пингидрата, 30 мг кислоты аскорбиновой.

Парацетамол обладает обезболивающим и жаропонижающим действием, близок по химической структуре к фенацетину и является его активным метаболитом, обуславливающим анальгетический эффект. Однако в отличие от фенацетина он не вызывает метгемогло-бинемии, не оказывает токсического действия на канальцевый аппарат почек. Кроме того, в отличие от аспирина парацетамол не обладает ulcerогенным действием, не вызывает желудочно-кишечных кровотечений и может применяться даже больными с язвенной болезнью; в отличие от анальгина не вызывает осложнений со стороны крови в виде гранулоцитопений и гранулоцитоза.

Фенилэфрин гидрохлорид (метазон) путем воздействия на альфа-адренорецепторы вызывает сужение артериол в слизистой оболочке носа, способствуя снятию отека и устранению слизи, ощущения заложенности носа, уменьшению ринореи и нормализации носового дыхания.

Кофеин потенцирует обезболивающее действие парацетамола, оказывает общетонизирующее действие, улучшает самочувствие больного.

Терпингидрат способствует разложению секрета в бронхах и более легкому его отхаркиванию; освобождая от закупорки дыхательные пути, способствует облегчению дыхания; обладает противовоспалительным действием.

Аскорбиновая кислота восполняет дефицит витамина С в организме, активизирует иммунную систему, нормализует тканевое дыхание, способствуя таким образом усилению защитных механизмов организма.

Известны и другие комбинированные препараты "Колдрекса": "Колдрекс хот рем" (порошок в пакетах для растворения в горячей воде) и "Колдрекс найт" (сироп), которые содержат, кроме парацетамола, прометазин гидрохлорид, обладающий седативным и жаропонижающим эффектами, а также антиаллергическими свойствами, и декстраметорфан гидробромид,

оказывающий противокашлевое действие. Он в отличие от кодеина не угнетает дыхание, не вызывает привыкания. Прием этих комбинированных препаратов целесообразен при болях в горле или затрудненном дыхании. Их прием в вечернее время обеспечивает противокашлевый эффект в течение ночи, что способствует нормализации сна.

Примером комбинированного препарата может служить также "Солпадеин солюбл", выпускаемый той же фармацевтической компанией в виде таблеток (500 мг парацетамола, 8 мг кодеина, 30 мг кофеина). Благодаря быстрому многонаправленному воздействию на периферические и центральные болевые рецепторы, препарат рекомендуется для купирования послеоперационного болевого синдрома. По эффективности превосходит анальгин.

Комбинированный препарат "Пафеин", выпускаемый в виде таблеток, содержащих 500 мг парацетамола и 50 мг кофеина (производитель ФФ "Дарница"), обладает мягким обезболивающим, жаропонижающим и противовоспалительным действием. Кофеин, входящий в состав "Пафеина", повышает, пролонгирует и ускоряет фармацевтическое действие парацетамола. Под действием "Пафеина" уменьшаются катаральные явления (слезотечение, першение в горле, насморк), быстро исчезают симптомы интоксикации (слабость, потливость и др.). "Пафеин" особенно эффективен при проявлении первых признаков заболевания.

Комбинированный препарат "Панадол экстра" содержит 500 мг парацетамола и 65 мг кофеина, является эффективным анальгетиком.

В последние годы на рынке лекарств реализуются многочисленные комбинированные препараты, содержащие парацетамол и антигистаминные, отхаркивающие, противокашлевые, бронхорасширяющие и противовоспалительные лекарственные средства. Так в "Томапирине" (производитель фирма "Берингер Инчельхайм") парацетамол (200 мг) сочетается с ацетилсалициловой кислотой (250 мг), что приводит к потенцированию анальгетического и жаропонижающего эффектов этих веществ. Сочетание этих веществ с кофеином (50 мг) приводит к повышению эффективности комбинации данного состава примерно на 40%, за счет чего появляется возможность уменьшения дозы парацетамола и ацетилсалициловой кислоты. Кроме того, это приводит к улучшению переносимости комбинированного препарата.

Димедрол и другие антигистаминные средства в сочетании с парацетамолом применяются для облегчения симптомов заболевания при бронхитах, аллергических ринитах. Такие лекарственные средства, как фенилэфрин, эфедрин, псевдоэфедрин и др. являются эффективными сосудосуживающими препаратами, снижающими отек слизистой оболочки носовых ходов. В комбинации с парацетамолом они используются для купирования головной боли, лихорадки, застойных явлений в слизистой оболочке верхних дыхательных путей у детей с ринитами, острыми респираторными заболеваниями. Противокашлевые средства (дифенгидрамин)

в сочетании с парацетамолом используются для облегчения головной боли, лихорадки, боли в горле и при кашле у больных гриппом и простудными заболеваниями. Консультативной комиссией по безрецептурным лекарственным препаратам при ВДА США допускаются комбинированные составы, содержащие парацетамол и три дополнительных компонента, в случае их использования для облегчения симптоматики, связанной с простудой, гриппом, аллергическим ринитом, бронхитом.

Известный комбинированный препарат "Гиналгин" в виде вагинальных таблеток (производитель "Польфа") содержит хлорхиналь-дол и метронидазол. Благодаря этому имеет широкий спектр действия в отношении анаэробных грамотрицательных и грамположительных бактерий. "Гиналгин" обладает высокой эффективностью при лечении вагинитов, вызванных бактериальной флорой, вагинального трихомониаза и вагинитов, вызванных одновременным воздействием бактерий, трихомонад и грибов.

В последнее время в медицинской практике широко применяются научно обоснованные составы комбинированных препаратов в виде мазей.

Использование комбинированных лекарственных препаратов, обладающих многонаправленным действием на симптомы того или иного заболевания позволяет максимально реализовать требования современной фармакотерапии, повысить ее эффективность и избежать многих, часто непредвиденных, побочных явлений.

Важным вопросом фармацевтической технологии является повышение растворимости труднорастворимых лекарственных веществ в воде и липидах, поскольку их биологическая доступность в значительной степени зависит от размера частиц. Известно также, что процесс растворения вещества связан с явлениями фазового перехода на границе твердое вещество — раствор. Интенсивность этого процесса зависит от площади поверхности раздела фаз. Однако диспергирование, даже микронизация веществ не всегда приводит к увеличению скорости их растворения и абсорбции. Увеличение межмолекулярных сил сцепления, наличие электрического заряда частиц ведет к их укрупнению — агрегации. Все это не позволяет получить водные растворы труднорастворимых веществ, а значит, и избежать таких нежелательных явлений, как абсцессы, денатурация белков, некрозы, обезвоживание тканей, эмболии, и прочих осложнений, которые наблюдаются при применении масляных и спиртовых растворов в виде инъекций.

Повышение растворимости лекарственных веществ в воде и других растворителях предполагает значительное повышение их эффективности. Добиться этого можно за счет использования:

- сорастворителей (бензил-бензоат, бензиловый спирт, пропилен-гликоль, полиэтиленоксиды и др.);
- гидротропных средств (гексаметиленetetрамин, мочевины, натрия бензоат, натрия салицилат, новокаин и др.);

- явления солюбилизации, например, витаминов А, D, Е, К, стероидных гормонов, барбитуратов, антибиотиков, сульфаниламидов, эфирных масел и т.д., которое позволяет повысить не только растворимость веществ, но и значительно увеличить их стабильность. Примером может служить лекарственная система в аэрозольной упаковке "Ингалипт";

- явления комплексообразования, например, иод хорошо растворяется в концентрированных растворах калия иодида, полиеновые антибиотики — в присутствии поливинилпирролидона. Кроме повышения растворимости лекарственных веществ, явление комплексообразования может значительно уменьшить раздражающую способность лекарственного вещества на слизистую или кожу. Например, такой антисептик, как иод, образуя комплексное соединение с поливиниловым спиртом, теряет присущее ему прижигающее действие, что и используется при получении "Йодинола". В некоторых случаях образование комплексных соединений приводит к заметному повышению биологической доступности образовавшегося продукта и одновременно — к значительному повышению его терапевтической эффективности. Так, комплекс левомицетин — поли-этиленоксид эффективнее самого антибиотика в 10-100 раз.

Значительному увеличению скорости растворения труднорастворимых веществ может способствовать использование так называемых твердых дисперсных систем, представляющих собой лекарственное вещество, диспергированное путем сплавления или растворения (с последующей отгонкой растворителя) в твердом носителе-матрице. Так, растворимость аймалина увеличивается в 40 раз, цинаризина — в 120 раз, резерпина — 200 раз и т.д. Кроме того, изменяя физико-химические свойства полимеров-носителей (молекулярную массу, растворимость), можно регулировать биодоступность лекарственной субстанции, создавать лекарственные формы направленного действия.

Важнейшей проблемой в фармацевтической технологии является стабилизация лекарственных систем. Связано это с тем, что лекарственные вещества, главным образом в процессе приготовления лекарственных препаратов и их хранения, под воздействием химических (гидролиз, омыление, окисление, полимеризация, рацемизация и др.), физических (испарение, изменение консистенции, расслаивание, укрупнение частиц) и биологических (прокисание и др.) явлений изменяют свои свойства. С этой целью для стабилизации гомогенных лекарственных систем (растворов для инъекций, глазных капель и др.) широко используют различные химические (добавление стабилизаторов, антиоксидантов, консервантов и т.д.) или физические методы (использование неводных растворителей, ампулирование в токе инертного газа, параконденсационный способ, нанесение защитных оболочек на таблетки и драже, микрокапсулирование и др.).

Для стабилизации гетерогенных лекарственных систем (суспензии, эмульсии) используют загустители и эмульгаторы в виде ПАВ и ВМС.

Здесь уместно привести пример "иммобилизованных" лекарственных средств: ферментов, гормонов, мукополисахаридов, железо-производных декстранов и альбумина для лечения анемии; гамма-глобулинов, нуклеиновых кислот, интерферона и др., которые создаются с целью стабилизации и пролонгации их действия.

Не менее важной проблемой фармацевтической технологии является продление времени действия лекарственных средств, так как во многих случаях необходимо длительное поддержание строго определенной концентрации препаратов в биожидкостях и тканях организма. Это требование фармакотерапии особо важно соблюдать при приеме антибиотиков, сульфаниламидов и других антибактериальных лекарств, при снижении концентрации которых падает эффективность лечения и вырабатываются резистентные штаммы микроорганизмов, для уничтожения которых требуются более высокие дозы лекарства, а это, в свою очередь, ведет к увеличению побочного действия.

Пролонгированного действия лекарств можно достигнуть использованием различных методов:

- физиологического, который обеспечивает изменение скорости всасывания или выведения вещества из организма. Это наиболее часто достигается путем охлаждения тканей в месте инъекции лекарства, использования кровососной банки или путем введения гипертонических или сосудосуживающих растворов, подавления выделительной функции почек;

- химического — посредством изменения химической структуры лекарственного вещества (путем комплексообразования, полимеризации, этерификации и пр.);

- технологического — за счет подбора носителя с определенными свойствами, изменения вязкости раствора, подбора вида лекарственной формы. Например, глазные капли с пилокарпином гидрохлоридом, приготовленные на дистиллированной воде, вымываются с поверхности роговицы глаза через 6-8 мин. Эти же капли, приготовленные на 1% растворе метилцеллюлозы и имеющие большую вязкость, а значит, и адгезию к поверхности всасывания, удерживаются на ней в течение 1 ч.

Заменяв глазные капли мазью, можно увеличить время действия последней по сравнению с водным раствором пилокарпина гидрохлорида почти в 15 раз. Таким образом, изменяя такой технологический показатель, как вязкость или вид лекарственной формы, можно увеличить время действия препарата и его эффективность.

Существуют и другие проблемы в фармацевтической технологии, решение которых может привести к созданию более совершенных лекарственных препаратов, а следовательно, и к более высокой их терапевтической эффективности, например, создание возрастных лекарств, повышение микробной чистоты лекарств, создание более прогрессивной тары и тароукупорочных материалов, внедрение малоотходных и экологически чистых

технологий, дальнейшее развитие биотехнологии и т.д., что, в свою очередь, шаг за шагом будет повышать качество и терапевтическую эффективность лекарств.

В последнее время фармакотехнологов и других специалистов привлекает проблема создания лекарств принципиально нового типа, так называемых лекарств направленного действия с заданными фармакокинетическими свойствами, которые в отличие от традиционных или классических лекарств характеризуются:

- пролонгированным действием;
- контролируемым высвобождением действующих веществ;
- их целевым транспортом к мишени.

Лекарства нового поколения принято называть терапевтическими системами, которые частично или полностью отвечают вышеуказанным требованиям.

Терапевтическая лекарственная система (ТЛС) — это устройство, содержащее лекарственное вещество или вещества, элемент, контролирующий высвобождение лекарственного вещества, платформу, на которой размещена система, и терапевтическую программу.

ТЛС обеспечивает постоянное снабжение организма лекарственными веществами в строго определенный промежуток времени. Они используются как для местного, так и для системного лечения. Примером таких лекарств могут быть "Окусерт", "Прогестасерт", "Трансдерм" и другие, которые являются пассивными системами. Имеются образцы активных терапевтических систем, действие которых запрограммировано извне или самопрограммируется. Такие терапевтические системы создаются за рубежом, дорогостоящие и поэтому не получили широкого распространения в медицинской практике.

Следует отметить, что оптимальную стратегию по созданию современных лекарственных препаратов можно выработать только на базе тщательно спланированных технологических и биофармацевтических экспериментальных исследований и квалифицированной интерпретации полученных данных.

Биотехнология традиционных лекарств и лекарств будущего.

С целью улучшения лечебных свойств традиционных лекарств усилия всех специалистов, разрабатывающих лекарственные препараты, направлены на использование новых технологий их получения, совершенствование составов, повышение специфичности и изучение как можно более полного механизма их действия на различные системы и органы человека. Продвижения в этом направлении все ощутимее и появляется надежда, что лекарственные препараты в следующем тысячелетии станут более действенными и эффективными средствами лечения многих заболеваний. Широко будут применяться лекарственные препараты в виде терапевтических систем и биопродуктов, особенно таких, как пептиды и пробелки, которые практически невозможно получить синтетически. Поэтому становится понятным

возрастающее значение биотехнологии для фармацевтической промышленности.

Сегодня биотехнология стремительно выдвигается на передний край научно-технического прогресса. Этому, с одной стороны, способствует бурное развитие современной молекулярной биологии и генетики, опирающихся на достижения химии и физики, а с другой стороны, — острая потребность в новых технологиях, способных улучшить состояние здравоохранения и охраны окружающей среды, а главное — ликвидировать нехватку продовольствия, энергии и минеральных ресурсов.

В качестве первоочередной задачи перед биотехнологией стоит создание и освоение производства лекарственных препаратов для медицины: интерферонов, инсулинов, гормонов, антибиотиков, вакцин, моноклональных антител и других, позволяющих осуществлять раннюю диагностику и лечение сердечно-сосудистых, злокачественных, наследственных, инфекционных, в том числе вирусных заболеваний.

По оценкам специалистов мировой рынок биотехнологической продукции уже к середине 90-х годов составил около 150 млрд долларов. По объему выпускаемой продукции и числу зарегистрированных патентов Япония занимает первое место среди стран, преуспевающих в области биотехнологии, и второе — по производству фармацевтической продукции. В 1979 году на мировой рынок было выпущено 11 новых антибиотиков, 7 из них синтезировано в Японии. В 1980 году фармацевтическая промышленность Японии освоила производство веществ широкой номенклатуры: пенициллинов, цефалоспоринов С, стрептомицина, полусинтетических антибиотиков второго и третьего поколений, противоопухолевых препаратов и иммуномодуляторов. Среди десяти ведущих мировых производителей интерферона — пять японских. С 1980 года фирмы активно включились в разработку технологий, связанных с иммобилизованными ферментами и клетками. Проводятся активные исследования, направленные на получение термостойких и кислотоустойчивых ферментов. 44% новых продуктов, полученных с помощью биотехнологий, нашли применение в фармации и только 23% — в пищевой или химической промышленности.

Биотехнология оказывает воздействие на различные отрасли промышленности Японии, включая производство вино-водочных изделий, пива, аминокислот, нуклеидов, антибиотиков; рассматривается как одно из самых перспективных направлений развития пищевого и фармацевтического производства и на этом основании включена в исследовательскую программу по созданию новых промышленных технологий. Существует государственная программа, направленная на разработку новых технологий получения гормонов, интерферонов, вакцин, витаминов, аминокислот, антибиотиков и диагностических препаратов.

Второе место после Японии по объему продуктов биотехнологии и первое место по производству фармацевтической продукции принадлежит США. На

антибиотики приходится 12% мировой продукции. Значительные успехи достигнуты в области синтеза инсулина, гормона роста человека, интерферона, фактора свертывания крови VIII, диагностических тестов, вакцины против гепатита В и других лекарственных препаратов, а также непрерывного процесса конверсии сахара в этиловый спирт. В 1983 году был синтезирован лейкоцитарный интерферон человека высокой чистоты. Методами генной инженерии овладели многие фармацевтические фирмы США. Быстро развиваются средства информации, связанные с биотехнологией. Определенные успехи в области биотехнологии имеются и в других странах мира.

Понятие "биотехнология" собирательное и охватывает такие области, как ферментационная технология, применение биофакторов с использованием иммобилизованных микроорганизмов или энзимов, генная инженерия, иммунная и белковая технологии, технология с использованием клеточных культур как животного, так и растительного происхождения.

Биотехнология — это совокупность технологических методов, в том числе и генной инженерии, использующих живые организмы и биологические процессы для производства лекарственных средств, или наука о разработке и применении живых систем, а также неживых систем биологического происхождения в рамках технологических процессов и индустриального производства.

Современная биотехнология — это химия, где изменение и превращение веществ происходит с помощью биологических процессов. В острой конкуренции успешно развиваются две химии: синтетическая и биологическая. Синтетическая химия, сочетая и перетасовывая атомы, переделывая молекулы, создавая новые вещества, неведомые в природе, окружила нас новым миром, который стал привычным и необходимым. Это — лекарства, моющие средства и красители, цемент, бетон и бумага, синтетические ткани и меха, пластинки и драгоценные камни, духи и искусственные алмазы. Но чтобы получить вещества "второй природы" необходимы жесткие условия и специфические катализаторы. Например, связывание азота происходит в промышленных прочных аппаратах при высокой температуре и огромном давлении. При этом в воздух выбрасываются столбы дыма, а в реки — потоки сточных вод. Для азотофиксирующих бактерий этого совсем не требуется. Имеющиеся в их распоряжении энзимы осуществляют эту реакцию в мягких условиях, образуя чистый продукт без отходов. Но самое неприятное заключается в том, что пребывание человека в окружении "второй природы" стало оборачиваться аллергией и другими опасностями. Неплохо бы держаться поближе к природе-матери. И если делать искусственные ткани, пленки, то хотя бы из микробного белка, если применять лекарственные препараты, то прежде всего те, которые вырабатываются в организме. Отсюда вырисовываются перспективы развития и использования в фармацевтической промышленности биотехнологий, где применяются живые клетки (в основном такие микроорганизмы, как бактерии и

дрожжевые грибки или отдельные ферменты, выполняющие роль катализаторов только определенных химических реакций). Обладая феноменальной избирательностью, ферменты осуществляют одну единственную реакцию и позволяют получить чистый продукт без отходов.

Однако ферменты нестойкие и быстро разрушаются, например, при повышении температуры трудно выделяются, их нельзя использовать многократно. Это и обусловило, главным образом, развитие науки об обездвиженных (иммобилизованных) ферментах. Основа, на которую "сажают" фермент, может иметь вид гранул, волокон, пленок из полимеров, стекла, керамики. Потери фермента при этом минимальны, а активность сохраняется месяцами. В настоящее время научились получать иммобилизованные бактерии, которые вырабатывают ферменты. Это упростило их использование в производстве и сделало метод более дешевым (не надо выделять фермент, очищать его). Кроме того, бактерии работают в десять раз дольше, что сделало технологический процесс экономичнее и проще. Традиционная ферментационная технология превратилась в биотехнологию со всеми признаками передовой технологии.

Ферментные технологии с большим экономическим эффектом стали применять для получения чистых аминокислот, переработки крахмалосодержащего сырья (например, кукурузного зерна в сироп, состоящий из глюкозы и фруктозы). За последние годы это производство превратилось в многотоннажное. Развиваются производства по переработке опилок, соломы, бытовых отходов в кормовую белок или спирт, который используют для замены бензина. Ферменты сегодня широко используются в медицине как фибринолитические препараты (фибринолизин + гепарин, стрептолизин); при расстройствах пищеварения (пепсин + хлористоводородная кислота, пепсидил, абомин, панкреатин, ораза, панкурмен, фестал, дигестал, трифермент, холеним и др.); для лечения гнойных ран, при образовании спаек, рубцов после ожогов и операций и т.д. Биотехнология позволяет получать большое количество ферментов медицинского назначения. Их используют для растворения тромбов, лечения наследственных заболеваний, удаления нежизнеспособных, денатурированных структур, клеточных и тканевых фрагментов, освобождения организма от токсических веществ. Так, с помощью тромболи-тических ферментов (стрептокиназа, урокиназа) спасена жизнь многим больным с тромбозом конечностей, легких, коронарных сосудов сердца. Протеазы в современной медицине применяются для освобождения организма от патологических продуктов, для лечения ожогов.

Известно около 200 наследственных заболеваний, обусловленных дефицитом какого-либо фермента или иного белкового фактора. В настоящее время делаются попытки лечения этих заболеваний с применением ферментов.

В последние годы все больше внимания уделяют ингибиторам ферментов. Ингибиторы протеаз, получаемые из актиномицетов (лейпептин, антипаин, химостатин) и генноинженерных штаммов *E. coli* (эглин) и дрожжей (ос-1

антитрипсин) эффективны при септических процессах, инфаркте миокарда, панкреатите, эмфиземе легких. Концентрацию глюкозы в крови больных диабетом можно уменьшить путем использования ингибиторов кишечных инвертаз и амилаз, отвечающих за превращение крахмала и сахарозы в глюкозу. Особой задачей является поиск ингибиторов ферментов, с помощью которых патогенные микроорганизмы разрушают антибиотики, вводимые в организм больного.

Новые возможности открывает генная инженерия и другие методы биотехнологии в производстве антибиотиков, обладающих высокой избирательной физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов. Однако антибиотики имеют и ряд недостатков (токсичность, аллергенность, устойчивость патогенных микроорганизмов и др.), которые существенно можно ослабить за счет их химической модификации (пенициллины, цефалоспорины), мутасинтеза, генной инженерии и других способов. Многообещающим подходом может служить инкапсулирование антибиотиков, в частности, включение их в липосомы, что позволяет прицельно доставлять лекарственное вещество только к определенным органам и тканям, повышает его эффективность и снижает побочное действие.

С помощью генной инженерии можно заставить бактерии вырабатывать интерферон — белок, выделяемый клетками человека в низких концентрациях при попадании в организм вируса. Он усиливает иммунитет организма, подавляет размножение аномальных клеток (противоопухолевое действие), используется для лечения болезней, вызываемых вирусами герпеса, бешенства, гепатитов, цитомегаловирусом, вызывающим опасное поражение сердца, а также для профилактики вирусных инфекций. Вдыхание аэрозоля интерферона позволяет предупредить развитие ОРЗ. Интерфероны оказывают лечебное действие при заболевании раком груди, кожи, гортани, легких, мозга, а также рассеяного склероза. Они полезны при лечении лиц, страдающих приобретенными иммунодефицитами (рассеянной миеломой и саркомой Капоци).

В организме человека вырабатывается несколько классов интерферона: лейкоцитарный (α), фибробластный (β-интерферон, удобный для массового производства, поскольку фибробласты в отличие от лейкоцитов размножаются в культуре), иммунный из Т-лимфоцитов и интерферон, образуемый эпителиальными клетками.

До введения методов генной инженерии интерфероны получали из лейкоцитов донорской крови. Технология сложная и дорогостоящая: из 1 л крови получали 1 мг интерферона (одна доза для инъекций).

В настоящее время α-, (β- и γ-интерфероны получают с применением штамма *E. coli*, дрожжей, культивируемых клеток насекомых (*Drosophila*). Очищают с использованием моноклональных (клон — совокупность клеток или

особей, произошедших от общего предка путем бесполого размножения) антител или другими способами.

Биотехнологическим методом получают и интерлейкины — сравнительно короткие (около 150 аминокислотных остатков) полипептиды, участвующие в организации иммунного ответа. Образуются в организме определенной группой лейкоцитов (микрофагами) в ответ на введение антигена. Используются как лечебные средства при иммунных расстройствах. Путем клонирования соответствующих генов в *E. coli* или культивирования лимфоцитов *in vitro* получают интерлейкин-L (для лечения ряда опухолевых заболеваний), фактор крови VIII (культивированием клеток млекопитающих), фактор IX (необходим для терапии гемофилии), а также фактор роста [3-лимфоцитов, фактор активизации макрофагов, Т-заместительный фактор, активатор тканевого плазминогена. Осуществлен биосинтез инсулина, в котором нуждаются миллионы больных во всем мире. Диабет, для лечения которого необходим инсулин, характеризуется избирательной гибелью клеток (островков Лангерганса поджелудочной железы), синтезирующих этот пептидный гормон.

До недавнего времени инсулин получали из поджелудочной железы быка и свиньи, первое производство которого освоила американская компания "Эли Лилли" (1922). Поджелудочная железа крупного рогатого скота и свиней извлекалась из туш животных, быстро замораживалась и в вагонах-рефрижераторах направлялась на фармацевтические предприятия, где и производилась экстракция гормона. 100 г кристаллического инсулина получали из 800-1000 кг сырья (поджелудочная железа быка весит 200-250 г).

В 1935 году был разработан инсулин пролонгированного действия путем добавления цинка (Дания), а в 1946 году — нейтральный кристаллический инсулин. Медицина получила в свое распоряжение пролонгированный (поглощается в течение 48 ч) и быстродействующий инсулины. В 60-е годы удалось разработать методы очистки гормона от глюкагона (антагонист инсулина) и соматостатина (подавляет выделение инсулина).

Инсулин состоит из двух полипептидных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот. Инсулин животного отличается от человеческого 1-3 аминокислотными радикалами, что является причиной возникновения аллергических реакций, особенно у детей, хотя по активности и времени действия они идентичны. Широкомасштабное применение инсулина в терапии сдерживалось его высокой стоимостью и ограниченностью сырьевых ресурсов.

В результате напряженных генноинженерных поисков компанией "Эли Лилли" в 1982 году был произведен инсулин на основе раздельного синтеза *E. coli* его А- и В-цепей. Этому достижению предшествовали широкомасштабные и дорогостоящие исследования по биосинтезу проинсулина, упрощению технологической схемы получения инсулина (на этапе экстракции и выделения), а также повышения выхода гормона, синтезируемого клетками специально сконструированных штаммов кишечной палочки. Стоимость готового продукта значительно снизилась, получаемый инсулин был идентичен

человеческому, фармацевтическое производство освободилось от перебоев в поставках животного сырья с боен, а главное, человеческий инсулин при длительном применении не вызывал неприятных последствий: нарушений работы почек, расстройств зрения и аллергических реакций.

В настоящее время заслуживают внимания генноинженерные человеческие инсулины — хумулины фирмы "Эли Лилли", различной продолжительности действия и инсулины германской фирмы "Хьост Мэрлон Руссель", используемые во всем мире миллионами людей. На базе завода эндокринноферментативных препаратов планируется производство украинского инсулина по лицензии фирмы "Хьост" в объеме, позволяющем полностью обеспечить годовую потребность в этом препарате. Инсулин по качеству будет отвечать международным стандартам.

Для лечения диабета используется также технология инкапсулирования: клетки поджелудочной железы в капсуле, введенные однократно в организм больного, продуцируют инсулин в течение года. В настоящее время актуальным является вопрос промышленного синтеза олигопептидных гормонов нервной системы — энкефалинов (построенных из 5 аминокислотных остатков), нейропептидов (вырабатываемых мозгом) и эндорфинов (аналогов морфина). Эти биологически активные вещества — продукты биотехнологии по праву называют лекарствами XXI века. При рациональном применении эти пептиды создают хорошее настроение, повышают работоспособность, концентрируют внимание, улучшают память, приводят в порядок режим сна и бодрствования. Они с успехом могут использоваться для лечения трудноизлечимых заболеваний: ожирения, нарушения процессов пищеварения, снимают болевой синдром.

Моноклональные антитела в сочетании с токсичными веществами для раковых клеток доставляют яд точно по адресу, избегая поражения здоровых клеток. В современной фармацевтической промышленности моноклональные антитела используются также для очистки лекарственных веществ.

Короткие фрагменты ДНК и РНК, несущие радиоактивную или иную метку (ДНК- или РНК-пробы), также используются для диагностики заболеваний (радиоиммунные методики).

Большое экономическое и социальное значение имеют разработки вакцин. Современные биотехнологические разработки предусматривают создание рекомбинатных вакцин, вакцин-антигенов, основанных на генноинженерном подходе: в ДНК известной основак-цины встраивают чужеродные гены, кодирующие иммуногенные белки возбудителей вирусов гриппа, герпеса, гепатита В и получают вакцину против соответствующей инфекции. В последние годы стало возможным создание поливалентной вакцины на основе объединения участков ДНК различных патогенов. Открывается возможность одномоментной комплексной иммунизации против многих опасных инфекций.

Вакцины-антигены получают, клонируя гены возбудителя болезни *E. coli*, в дрожжах. Вакцины-антигены стабильны при хранении, содержат

минимальное количество белка и поэтому малоопасны как аллергены. Однако они имеют низкую иммуногенность. Для повышения иммуногенности прибегают к иммобилизации или включают их в липосомы.

Отмечая несомненные успехи разработок в области фармации и медицины, нельзя не упомянуть об успехах биотехнологии в пищевой промышленности, где ее интересы тесно переплетены с медициной и связаны с поиском низкокалорийных, не опасных для больных диабетом заменителей сахара (сахароза), перспективным применением корригентов типа аспартама

Таким образом, в настоящее время у нас в стране и за рубежом разрабатываются и выпускаются различные виды лекарственных форм пролонгированного действия от более простых таблеток, гранул, драже, спансул до более сложных имплантируемых таблеток, таблеток системы "Oros", терапевтических систем с саморегуляцией. При этом необходимо отметить, что развитие лекарственных форм пролонгированного действия связано с широким использованием новых вспомогательных веществ, в том числе полимерных соединений.

Согласно прогнозу в начале XXI века следует ожидать значительного прогресса в разработке новых лекарственных препаратов, содержащих новые субстанции, а также с использованием новых систем введения и доставки в организм человека с их программированным распределением.

Таким образом, не только широкий ассортимент лекарственных веществ, но и многообразие их лекарственных форм позволит проводить эффективную фармакотерапию с учетом характера заболевания.

Следует также отметить необходимость изучения и использования в фармацевтической технологии последних достижений коллоидной химии и химической технологии, физико-химической механики, коллоидной химии полимеров, новых способов диспергирования, сушки, экстракции, применения нестехиометрических соединений.

Совершенно очевидно, что решение этих и других вопросов, стоящих перед фармацией, потребует разработки новых технологий производства и методов анализа лекарственных препаратов, использования новых критериев оценки их эффективности, а также изучения возможностей внедрения в практическую фармацию и медицину.

1.13. Биохимические подходы в клинической практике

Органы и ткани многоклеточных организмов отличаются друг от друга не только по морфологическим и анатомическим признакам, химическому составу, но и по характеру протекающих в них метаболических процессов, который, в свою очередь, определяется "набором" ферментов и их активностью. Особенности распределения ферментов в различных органах и тканях можно использовать в клинической практике для диагностики заболеваний. Повышение активности ферментов в плазме (сыворотке) крови

связано прежде всего с цитолизом (т.е. увеличением проницаемости плазматических мембран, мембран лизосом, других органелл, их некрозом) и выходом энзимов из поврежденных органов и тканей в кровяное русло. При этом содержание и активность фермента в поврежденном органе снижается, а в плазме (сыворотке) крови – повышается. Следует учитывать, что благодаря общей реакции организма ферменты переходят в плазму не только из поврежденного органа, но также из клеток других органов и тканей, не затронутых патологическим процессом.

Следует помнить, что в процессе свертывания крови и последующей ретракции сгустка высвобождаются содержащиеся в тромбоцитах биологически активные вещества, под влиянием которых возрастает активность многих ферментов. Происходящее при этом разрушение форменных элементов крови обуславливает дальнейшее увеличение ферментативной активности, оказывающейся, как правило, в сыворотке более высокой, чем в плазме. Этим объясняется необходимость не допускать гемолиза, например, при исследовании активности лактатдегидрогеназы в крови.

Необходимо также учитывать, что многие антикоагулянты способны оказывать влияние на активность ферментов. Например, оксалаты подавляют активность лактатдегидрогеназы, а салицилаты повышают активность аминотрансфераз. Для сохранения ферментативной активности в моче ее оставляют на 3 часа при 4 °С, затем центрифугируют для осаждения солей, доводят рН до 7,0 и добавляют глицерин (30 мл/л). Ферментативную активность в моче относят к 1 г креатинина, так как концентрация последнего в моче всегда коррелирует со степенью гломерулярной фильтрации.

Щелочная фосфатаза (К.Ф. 3.1.3.1) - цинк-содержащий димерный фермент, каждый мономер которого содержит 3 металлосвязывающих центра. Содержится в костной ткани, печени, кишечнике, плаценте, лактирующей молочной и предстательной железах. У практически здоровых людей в сыворотке (плазме) крови присутствует в основном печеночная и костная щелочная фосфатаза, хотя возможно и присутствие фермента, образованного в кишечнике, реже – плаценте и почках. Повышение активности щелочной фосфатазы происходит, главным образом, при костных заболеваниях, связанных с пролиферацией остеобластов, и болезнях, сопровождающихся явлениями холестаза. Активность данного фермента в сыворотке крови возрастает и при некоторых заболеваниях кишечника (язвенном колите, кишечных инфекциях). Снижение активности щелочной фосфатазы возникает при гипотиреозе, цинге, остеопорозе, выраженной анемии, кретинизме.

Щелочная фосфатаза сыворотки крови стабильна и может храниться несколько суток при комнатной температуре. В замороженном же состоянии активность щелочной фосфатазы снижается. Антикоагулянты (гепарин, тартраты, ЭДТА) снижают активность фермента, поэтому плазма крови не может использоваться для исследования активности щелочной фосфатазы. Наиболее распространенный способ определения активности данного

фермента – метод Бессея-Лоури-Брока, основанный на ферментативном гидролизе р-нитрофенилфосфата. Освобожденный в ходе реакции р-нитрофенол в щелочной среде имеет желтое окрашивание, интенсивность поглощения которого при 415 нм пропорциональна активности фермента.

Аланинаминотрансфераза (К.Ф. 2.6.1.2) – пиридоксаль-зависимый фермент, содержащийся в цитоплазме всех паренхиматозных органов (особенно в печени). Исследование активности данного фермента в сыворотке крови имеет исключительно важное значение для диагностики и дифференциальной диагностики болезней печени: при инфекционном гепатите, остром вирусном гепатите, хронических гепатитах, а также при гемолитической болезни, у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, у практически здоровых людей, находящихся на белковой диете или таковой, содержащей 25-30% сахарозы.

Активность аланинаминотрансферазы в эритроцитах в 6 раз превышает таковую в сыворотке (плазме) крови, что следует учитывать при анализе гемолизированной сыворотки. Измерение активности фермента проводится кинетическим методом, в котором образовавшийся в результате переаминирования пируват восстанавливают в лактат с одновременным окислением НАДН при действии лактатдегидрогеназы и измеряют снижение оптической плотности при 340 нм.

Аспартатаминотрансфераза (К.Ф. 2.6.1.1) – пиридоксаль-зависимый фермент, содержащийся у млекопитающих в сердце, печени, скелетной мускулатуре, нервной системе и почках. Наиболее часто активность данного фермента используют с целью диагностики заболеваний миокарда, например, при инфаркте. При этом повышение активности аспартатаминотрансферазы наблюдается при таких его формах, которые не диагностируются электрокардиографически.

Активность данного фермента в эритроцитах незначительна и составляет около 1/10 активности плазмы, поэтому слабый гемолиз существенно не влияет на величину активности фермента сыворотки (плазмы) крови. Измерение активности фермента проводится кинетическим методом, в котором образовавшийся в результате переаминирования оксалоацетат восстанавливают в малат с одновременным окислением НАДН при действии малатдегидрогеназы и измеряют снижение оптической плотности при 340 нм.

Лактатдегидрогеназа (К.Ф. 1.1.1.27) – гликолитический цитозольный цинк-содержащий фермент, обратимо катализирующий окисление L-лактата в пируват. По степени убывания активности данного фермента органы и ткани располагаются в следующем порядке: почки, сердце, мышцы, поджелудочная железа, селезенка, печень, легкие. Увеличение активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови возрастает при всех видах анемии, заболеваниях печени, опорно-двигательного аппарата и почек, опухолях, инфаркте миокарда и легкого.

Лактатдегидрогеназа содержится не только в плазме, но и в эритроцитах крови, поэтому сыворотка, используемая для анализа, должна быть свежей, без следов гемолиза. Измерение активности фермента проводят кинетическим методом, в котором лактат в щелочной среде в присутствии лактатдегидрогеназы сыворотки и добавленного НАД⁺ окисляется в пируват. О накоплении пирувата судят по нарастанию оптической плотности при длине волны 340 нм.

В организме млекопитающих *кислая фосфатаза* (КФ 3.1.3.2) представлена 3 изоферментами: КФ II находится в предстательной железе, в крови практически здоровых людей она постоянно обнаруживается после достижения полового созревания; КФ III находится в печени и других паренхиматозных органах; КФ IV присутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Повышение активности данного фермента в крови свидетельствует о новообразованиях в простате, бывает следствием поражения гепатобилиарной системы, повышенного разрушения тромбоцитов, ревматических процессов. Ложное повышение активности кислой фосфатазы может наблюдаться при лихорадочных состояниях.

Кислая фосфатаза при комнатной температуре быстро теряет свою активность, поэтому сыворотку надо получать и использовать быстро.

Глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.2) – цинк-содержащий митохондриальный фермент, локализованный, в основном, в печени, сердце и почках. Имеет особое значение для диагностики заболеваний печени (хроническом гепатите, механической желтухе, раке печени, острой интоксикации, остром нарушении кровообращения в печени). Данный маркер считается наиболее информативным показателем активности и тяжести процесса при обострении хронического гепатита.

Для определения активности глутаматдегидрогеназы используют спектрофотометрический метод, основанный на восстановлении 2-оксоглутарата в глутамат при одновременном окислении молекулы НАДН, что сопровождается пропорциональным скорости реакции снижением величины оптической плотности, измеряемой при длине волны 340 нм.

Панкреатическая липаза (КФ 3.1.1.3) – фермент поджелудочной железы, участвующий в разрушении сложноэфирных связей триацилглицеринов с высвобождением молекулы глицерола и жирных кислот.

Активность липазы в сыворотке крови отмечается при панкреатитах любого происхождения, при желчной колике, ожирении, подагре, почечной недостаточности.

Перед определением активности фермента сыворотку необходимо отделить от сгустка так быстро, как это возможно. Определение активности фермента проводят по методу Гольдштейна-Роя, основанного на кислотно-основном титровании. За 1 ед. активности липазы принимают меру активности, под действием которой за 1 час инкубации при 37 °С из трибутирина

высвобождаются жирные кислоты, содержанием которых соответствует такому в 1 мл 0,1 н раствора жирной кислоты.

Электронные ресурсы по теме

1. Прикладная биохимия: презентации лекций [электронный ресурс] / БГУ, факультет биологии. – Режим доступа: http://bio.bsu.by/biohim/kursy_mag3.html
– Дата доступа: 21.03.2022.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Учебным планом II ступени получения высшего образования для студентов специальности 1-31 80 11 Биохимия предусмотрено проведение практических занятий.

Практическая работа.

Практическая работа. Выявление нарушений обмена веществ у лабораторных крыс с экспериментальными патологиями посредством анализа общепринятых клинических маркеров сыворотки крови.

В работе используют интактных лабораторных крыс (контроль) и животных с индуцированной экспериментальной патологией, о которой заранее студентам не сообщается. Целью данной работы является установление нарушений обмена веществ у экспериментальных крыс на основании сравнения величин основных диагностических маркеров сыворотки крови контрольных и подопытных животных.

1.1. Получение сыворотки крови

Кровь крысы (2 – 3 мл) собирают в сухую центрифужную пробирку и оставляют на 30 мин при 37 °С. По истечении указанного времени тонкой стеклянной палочкой осторожно обводят стенки пробирки для отделения от них сгустка, кровь центрифугируют (10 мин, 3000 об/мин). Полученную сыворотку сливают в чистую пробирку и используют в дальнейшей работе.

1.2. Определение основных маркеров углеводного обмена

1.2.1. Определение глюкозы с антроном

Принцип метода. Образующиеся при нагревании глюкозы с концентрированной серной кислотой фурфурол и его производные дают с антроном окрашенные соединения. По интенсивности окраски судят о количестве глюкозы.

Реактивы. 0,2% раствор антрона, приготовленный на концентрированной серной кислоте.

Ход работы. Перед началом определения исходную сыворотку необходимо развести дистиллированной водой в 50 раз (0,05 мл сыворотки + 2,45 мл дистиллированной воды).

В пробирку, стоящую на льду, помещают 2,5 мл исследуемого раствора и осторожно приливают 5 мл свежеприготовленного 0,2 % раствора антрона. Пробу тщательно перемешивают и ставят в кипящую водяную баню. Через 10 минут пробу охлаждают в бане с ледяной водой и развившуюся зеленую со слабым синеватым оттенком окраску фотометрируют при 620 нм на КФК-2 против контрольной пробы, состоящей из 2,5 мл дистиллированной воды и 5 мл

0,2 % раствора антрона. Концентрацию глюкозы определяют по калибровочному графику (Рисунок 25).

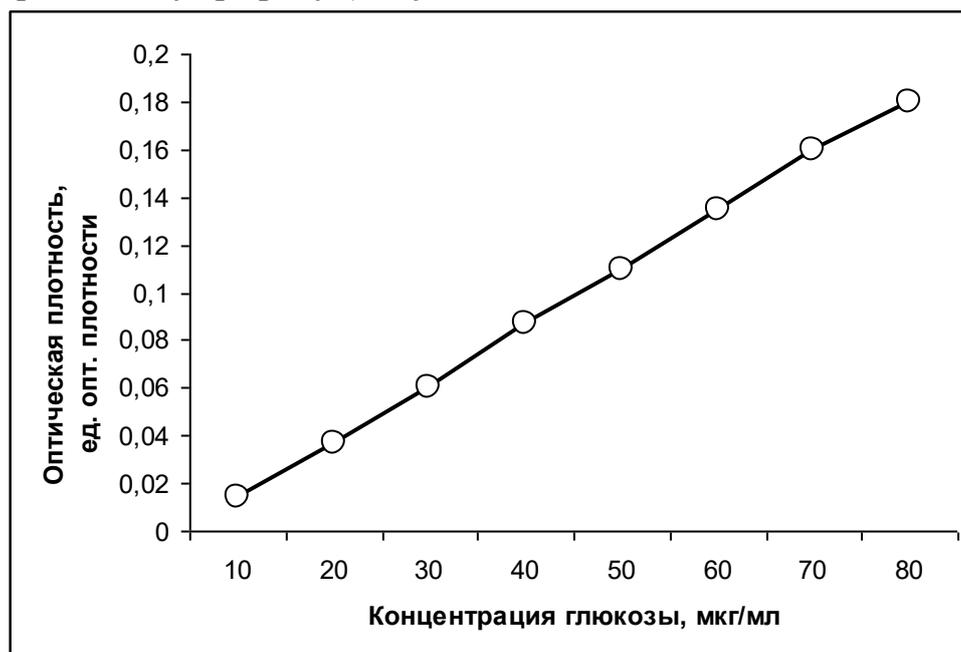


Рисунок 25 - Калибровочная прямая для определения концентрации глюкозы в сыворотке крови антроновым методом.

1.2.2. Определение активности α -амилазы по методу Каравая

Принцип метода.

Метод основан на колориметрическом определении концентрации крахмала до и после его ферментативного гидролиза α -амилазой.

Реактивы.

1. Раствор крахмала.

Для приготовления данного реактива 13,3 г Na_2HPO_4 и 4,3 г бензойной кислоты растворяют в 250 мл горячей дистиллированной воды. Отдельно суспендируют 0,2 г растворимого крахмала в 100 мл холодной воды, смешивают полученные растворы, затем полученную смесь охлаждают и доводят водой до 500 мл.

2. Реактив Люголя (основной раствор йода).

3. Рабочий раствор йода. Перед работой к 5 мл основного раствора йода доливают 45 мл дистиллированной воды.

Ход работы.

В опытную пробу вносят 1 мл раствора крахмала, прогревают 5 мин в термостате при $+37\text{ }^\circ\text{C}$, после чего к нему добавляют 0,02 мл негемолизированной сыворотки крови. Пробу вновь помещают на 5 мин в термостат. Контрольную пробу готовят аналогично опытной, но сыворотку в нее не добавляют. Затем во все пробирки доливают по 1 мл рабочего раствора йода и по 8 мл дистиллированной воды, содержимое пробирок хорошо перемешивают и содержащиеся в них растворы колориметрируют при 630 – 690 нм на

фотоэлектроколориметре КФК-2 в кювете с шириной слоя 1 см. В качестве раствора для сравнения при измерении оптической плотности используют дистиллированную воду.

Расчет активности амилазы проводят по формуле:

A_x [г крахмала/л сыворотки · час] = 240 · (($D_{к.}$ - $D_{оп.}$)/ $D_{к.}$), где

$D_{оп.}$ – оптическая плотность опытной пробы, $D_{к.}$ – оптическая плотность контрольной пробы.

1.2.3. Определение пировиноградной кислоты модифицированным методом Умбрайта

Принцип метода.

Пировиноградная кислота (ПВК) конденсируется с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ) с образованием гидразона, который в щелочной среде дает коричнево-красный цвет раствора. По интенсивности его окраски судят о содержании ПВК.

Основное отличие предлагаемого метода от оригинального заключается в том, что ПВК исследуют непосредственно в сыворотке крови, а не в ее толуоловом экстракте.

Реактивы.

1. 10 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).
2. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). 50 мг реактива растворяют в 10 мл концентрированной соляной кислоты при слабом подогревании смеси. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 50 мл.
3. 12 % раствор NaOH.
4. 0,01 % раствор пировиноградной кислоты.

Ход работы.

В центрифужной пробирке смешивают 0,3 мл крови и 0,7 мл дистиллированной воды. К гемолизату приливают 1 мл 10 % раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой и через 3 мин центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость полностью сливают в пробирку, приливают 0,4 мл раствора ДНФГ, содержимое пробирки тщательно перемешивают и на 20 мин помещают в темное место при комнатной температуре.

По истечении этого срока в пробирку приливают 1 мл 12 % раствора NaOH и через 5 мин определяют оптическую плотность раствора на ФЭКе с синим светофильтром в кюветах с шириной слоя 5 мм против контрольной пробы следующего состава: 1 мл дистиллированной воды, 1 мл 10 % раствора ТХУ, 0,4 мл раствора ДНФГ, 1 мл 12 % раствора NaOH.

Содержание ПВК в опытных пробах находят по калибровочному графику (Рисунок 26).

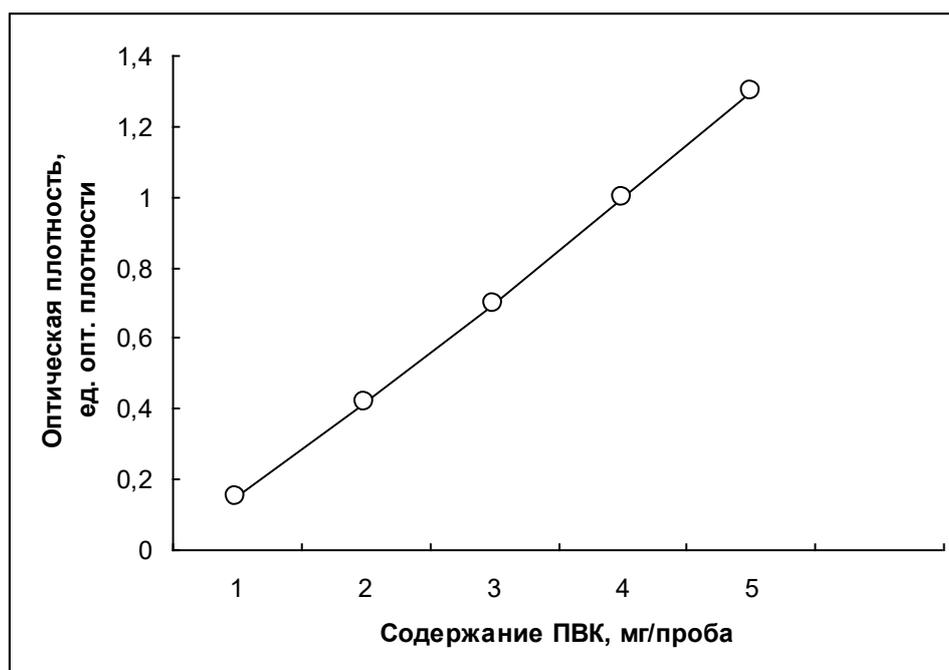


Рисунок. 26 - Калибровочная прямая для определения содержания пирувиноградной кислоты в крови крыс по методу Умбрайта.

Полученные в ходе работы результаты вносят в таблице 6.

Таблица 6 – Изменение основных биохимических маркеров углеводного обмена у крыс с экспериментальной патологией.

Вариант опыта	Содержание пирувата, мг/проба $X \pm Sx$	Концентрация мочевины, моль/л $X \pm Sx$	Активность амилазы, МЕ $X \pm Sx$	Содержание глюкозы, мкг/мл $X \pm Sx$
Интактные крысы				
Подопытные крысы				

На основании данных таблицы 1 делают заключение о состоянии углеводного обмена у крыс с экспериментальной патологией.

1.3. Определение основных маркеров белкового обмена

1.3.1. Определение содержания общего белка в сыворотке крови по методу Бенедикта

Принцип метода.

Метод Бенедикта основан на способности белков давать с раствором сернокислой меди фиолетовое окрашивание в щелочной среде. Для этого метода необходимо наличие двух ОН-групп и трех атомов азота, находящихся в полипептидной цепи. Группа, образующая пептидную связь (– ОС – NH –) в

щелочной среде, присутствует в своей таутомерной форме. В избытке щелочи происходит диссоциация водорода енольной ОН-группы, при этом возникает отрицательный заряд, с помощью которого кислород, взаимодействуя с медью, образует соль; кроме того медь образует дополнительные связи с атомами азота пептидных связей. Возникший комплекс характеризуется высокой стабильностью.

Реактивы.

1. 3 % раствор NaOH.
2. Реактив Бенедикта. Для приготовления реактива Бенедикта 17,3 г цитрата натрия и 10 г Na_2CO_3 растворяют при подогревании в 40 мл дистиллированной воды. В раствор добавляют 1,73 г сульфата меди, растворенного в 10 мл воды. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Ход работы.

Перед началом работы исходную сыворотку развести в 20 раз (50 мкл сыворотки и 950 мкл дистиллированной воды).

К 1 мл исследуемого образца добавляют 3 мл 3 % раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Раствор хорошо перемешивают и через 15 мин определяют его оптическую плотность при 330 нм на СФ-26 против контрольного раствора, состоящего из 1 мл дистиллированной воды, 3 мл раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Содержание белка рассчитывают далее по калибровочному графику (Рисунок 26).

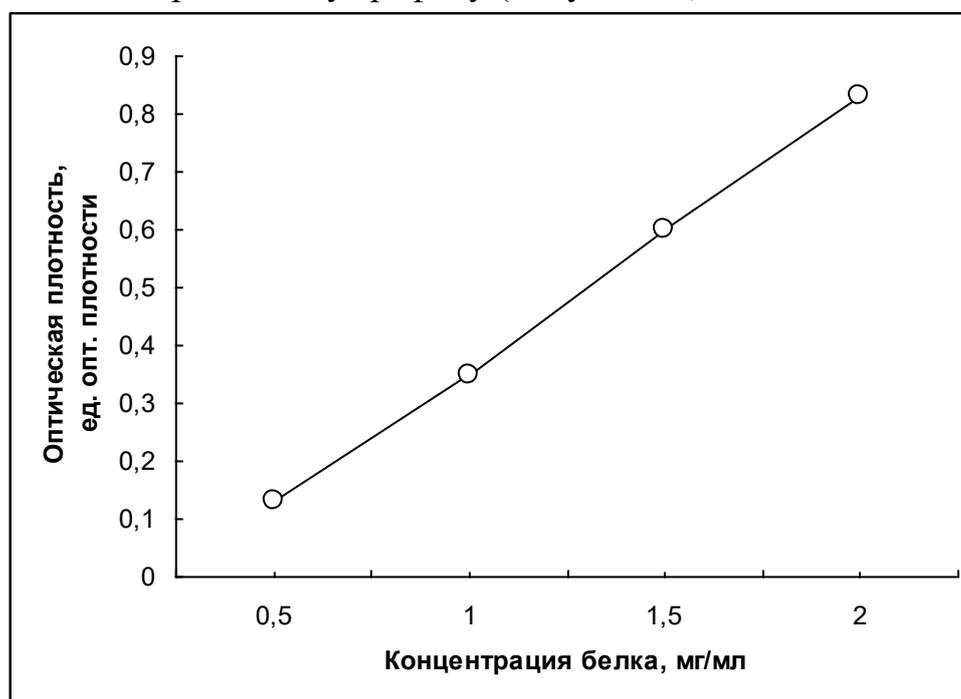


Рисунок 26 - Калибровочная прямая для определения содержания белка по методу Бенедикта.

1.3.2. Определение содержания альбумина в сыворотке крови

Принцип метода.

При взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде в присутствии детергента образуется окрашенный комплекс, интенсивность сине-зеленого цвета которого прямо пропорциональна концентрации альбумина в анализируемом образце.

Реактивы.

Рабочий раствор, содержащий 50 ммоль/л ацетатный буфер (рН 4,2), 6,6 % раствор холата натрия, 0,007 % раствор бромкрезолового зеленого.

Ход работы.

К 1 мл рабочего раствора добавляют 10 мкл исследуемого образца сыворотки крови, тщательно перемешивают. Через 10 мин измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 670 – 690 нм (красный светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 1 см против контрольной пробы, в которую вместо сыворотки крови вносят 10 мкл дистиллированной воды. Содержание альбумина в исследуемых растворах рассчитывают по калибровочному графику (Рисунок 27).

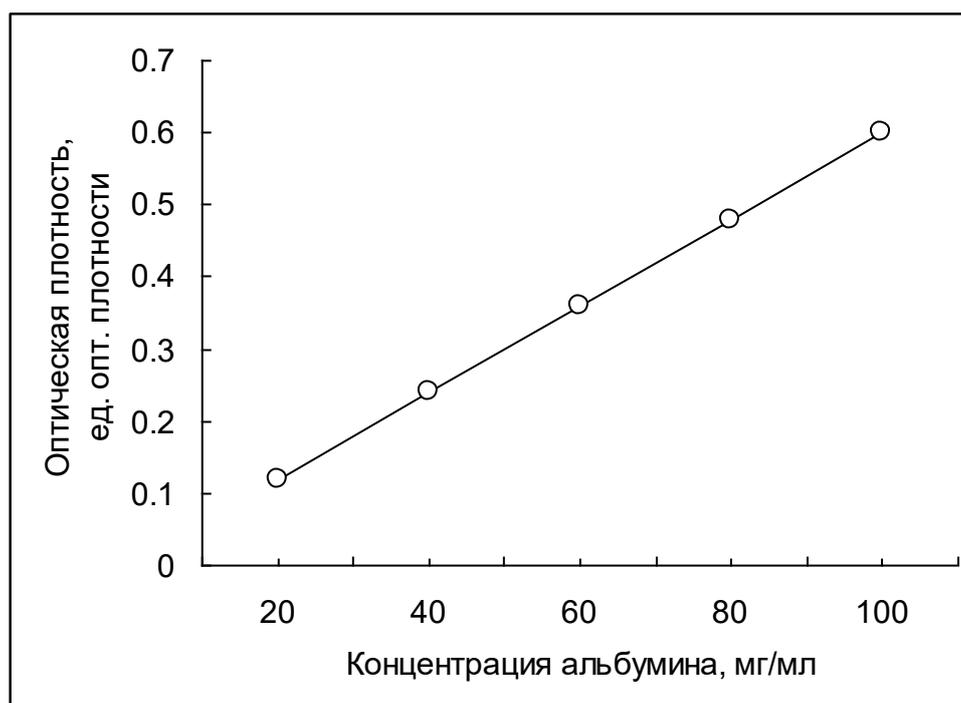


Рисунок 27 - Калибровочная прямая для определения содержания альбумина в сыворотке крови крыс.

1.3.3. Определение мочевины крови уреазным методом по реакции с реактивом Несслера

Принцип метода.

Метод основан на разложении мочевины уреазой с последующим измерением количества образующегося аммиака колориметрическим способом с использованием реактива Несслера.

Реактивы.

1. Препарат уреазы. Для приготовления данного препарата очищают 4 семечка арбуза (тыквы), извлеченные зерна растирают в ступке с 10 мл дистиллированной воды. Полученную эмульсию фильтруют и используют для работы.

2. 7,5 % раствор сульфата цинка.
3. 1,5 % раствор NaOH.
4. 0,2 % раствор тартрата К, Na.
5. Реактив Несслера (коммерческий препарат).
6. 5 ммоль/л стандартный раствор мочевины.

Ход работы.

В 2 пробирки – опытную и стандартную – вносят по 1,5 мл дистиллированной воды. Затем в опытную пробу добавляют 0,1 мл сыворотки крови, а в стандартную – 0,1 мл стандартного раствора мочевины, после чего в каждую из пробирок приливают по 0,5 мл препарата уреазы.

Содержимое пробирок перемешивают. Пробирки плотно закрывают корковыми пробками, выдерживают 20 мин в термостате при +37 °С, охлаждают и добавляют в каждую пробирку по 0,2 мл 7,5% раствора сульфата цинка и по 0,2 мл 1,5 % раствора NaOH.

После тщательного перемешивания производят центрифугирование (10 мин, 3000 об/мин), из каждой пробы отбирают по 1,25 мл супернатанта, который переносят в 2 другие чистые пробирки. В них приливают по 2,25 мл 0,2% раствора тартрата К, Na и по 0,5 мл реактива Несслера. Содержимое пробирок перемешивают и колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кювете с шириной слоя 5 мм против контрольной пробы.

Контрольную пробу готовят путем добавления к 1,25 мл дистиллированной воды 2,25 мл 0,2% раствора тартрата К, Na и 0,5 мл реактива Несслера.

Расчет содержания мочевины ведут по формуле:

$$X[\text{моль/л}] = (D_{\text{оп.}} - D_{\text{к}}) / (D_{\text{с}} - D_{\text{к}}) \cdot 5, \text{ где}$$

$D_{\text{оп.}}$, $D_{\text{к}}$, $D_{\text{с}}$ – оптическая плотность опытной, контрольной и стандартной проб соответственно.

1.3.4 Проба коллоидоустойчивости (коагуляционная лента Вельтмана)

Принцип метода.

Устойчивость сыворотки крови как коллоидной системы к действию денатурирующих факторов зависит от соотношения между содержанием в ней альбуминов, характеризующихся высокой гидрофильностью и выполняющих функцию защитных коллоидов, и глобулинов, среди которых встречается большое количество сравнительно гидрофобных белков. Положительный результат коллоидных проб обусловлен количественными изменениями в содержании отдельных фракций (α -, β -, γ -) глобулинов или уменьшением соотношения альбумины/глобулины. В случае отсутствия сдвигов в

показателях концентрации глобулинов либо коэффициента альбумины/глобулины значение имеет увеличение содержания более грубодисперсных фракций (γ -глобулинов) в глобулиновой системе.

В норме коагуляционная лента начинается с первой и кончается 6-7 пробирками. Сдвиг ленты вправо (расширение) наблюдается при болезни Боткина, циррозах, малярии, после переливания крови, воспалительных процессах. Сужение ленты отмечается при ревматизме, туберкулезе, нефрозах, острых инфекционных заболеваниях, злокачественных опухолях.

Реактивы:

Растворы хлорида кальция следующей концентрации: 0,1; 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01 г/мл.

Ход работы:

В каждую пробирку вносят 0,1 мл сыворотки и 5,0 мл раствора хлористого кальция соответствующей концентрации. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 15 мин, после чего отмечают коагуляцию и делают соответствующие выводы.

Полученные в ходе работы результаты вносят в Таблицу 7, делают заключение о состоянии белкового обмена подопытных животных.

Таблица 7 – Изменение основных биохимических маркеров белкового и азотистого обмена у крыс с экспериментальной патологией.

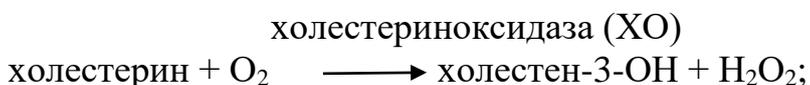
Вариант опыта	Содержание общего белка, мг/проба $X \pm Sx$	Содержание альбумина, моль/л $X \pm Sx$	Результаты пробы коллоидоустойчивости, № пробирок с осадком	Содержание мочевины, моль/л, $X \pm Sx$
Интактные крысы				
Подопытные крысы				

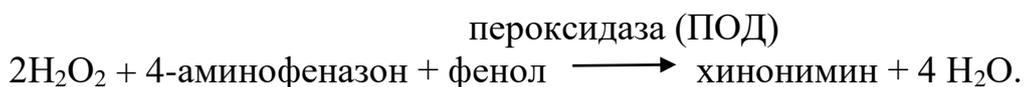
1.4. Определение основных маркеров липидного обмена

1.4.1. Определение концентрации холестерина фотометрическим ферментативным методом с липид-осветляющим фактором

Принцип метода.

Метод предполагает определение холестерина после его ферментативного гидролиза и окисления. Индикатором является хинонимин, образуемый из перекиси водорода и 4-аминофеназона в присутствии фенола и пероксидазы.





Липемические пробы, как правило, являются причиной помутнения реакционной смеси, что может привести к ложно завышенным результатам. Данный метод позволяет избежать ложного завышения результатов благодаря содержащемуся в нем липид-осветляющему фактору, который способствует полному исчезновению помутнения в липемических пробах.

Реактивы.

1. Ферментный реагент, состоящий из 100 ммоль/л Na-фосфатного буфера (рН 6,5), 0,3 ммоль/л 4-аминофеназона, 5 ммоль/л фенола, пероксидазы (>5 кЕд/л), холестеринэстеразы (>150 Ед/л), холестериноксидазы (>100 Ед/л).

2. 5,17 ммоль/л стандартный раствор холестерина.

Ход работы.

К 1 мл ферментного реагента добавляют 10 мкл исследуемой сыворотки, тщательно перемешивают и инкубируют 10 мин при комнатной температуре. По истечении указанного времени измеряют величину оптической плотности при 500 нм против контрольной пробы, состоящей из 1 мл ферментного реагента.

Аналогичным образом готовят стандартную пробу, включающую в себя 1 мл ферментного реагента указанного состава и 10 мкл стандартного раствора холестерина.

Расчет концентрации холестерина проводят по формуле:

$$C_{\text{холест}} (\text{ммоль/л}) = 5,17 \times A \text{ пробы} / A \text{ стандарта}.$$

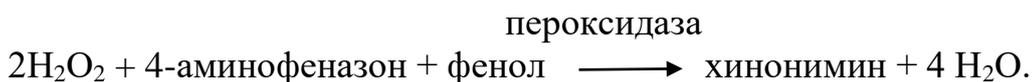
1.4.2. Определение концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности фотометрическим ферментативным методом

Принцип метода.

Хиломикроны, ЛПОНП и ЛПНП осаждаются при добавлении фосфорновольфрамовой кислоты и хлорида магния. После центрифугирования надосадочная жидкость содержит ЛПВП-фракцию, которая анализируется на содержание ЛПВП.

Определение холестерина липопротеинов высокой плотности проводят после его ферментативного гидролиза и окисления. Индикатором является хинонимин, который образуется из перекиси водорода и 4-аминофеназона в присутствии фенола и пероксидазы:





Реактивы.

1. Осадитель, состоящий из 0,55 ммоль/л фосфорно-вольфрамовой кислоты и 25 ммоль/л хлорида магния.

2. Ферментный реагент, состоящий из 100 ммоль/л Na-фосфатного буфера (рН 6,5), 0,3 ммоль/л 4-аминофеназона, 5 ммоль/л фенола, пероксидазы (>5 кЕд/л), холестеринэстеразы (>150 Ед/л), холестериноксидазы (>100 Ед/л).

Ход работы.

К 0,2 мл анализируемого образца добавляют 0,4 мл осадителя, хорошо перемешивают и инкубируют 10 мин при комнатной температуре. По истечении времени инкубации пробы центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин, супернатант отбирают в чистую пробирку и используют его для определения концентрации ЛПВП.

Для этого к 0,1 мл супернатанта добавляют 1 мл ферментного реагента, тщательно перемешивают и инкубируют 10 мин при комнатной температуре. Затем измеряют величину поглощения опытной пробы при 500 нм против контрольной пробы, состоящей только из компонентов ферментного реагента.

Аналогичным образом готовят стандартную пробу, в которую вместо анализируемого образца сыворотки крови вносят 25 мкл стандартного препарата ЛПВП.

Расчет концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности:

$$C_{\text{ЛПВП}} (\text{ммоль/л}) = 3,87 \times A \text{ пробы} / A \text{ стандарта}.$$

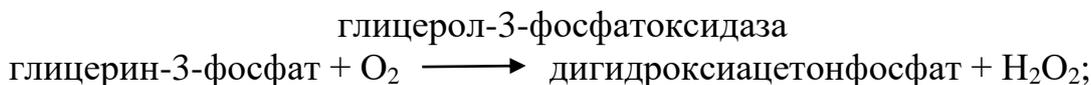
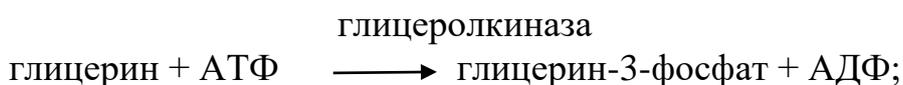
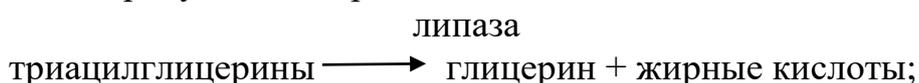
Расчет концентрации холестерина липопротеинов низкой плотности:

$$C_{\text{ЛПНП}} (\text{ммоль/л}) = \text{ОХ} - \text{ЛПВП} - \text{ТГ} / 2,2.$$

1.4.3. Определение содержания триацилглицеринов фотометрическим ферментативным методом с липид-осветляющим фактором

Принцип метода.

Метод предполагает определение триацилглицеринов после ферментативного гидролиза липазой. Индикатором является хинонимин, который образуется из перекиси водорода и 4-амино-антипирина и 4-хлорфенола в присутствии пероксидазы:



ПОД



Реактивы.

1. Рабочий реагент, состоящий из 50 ммоль/л PIPES-буфера (рН 7,5), 5 ммоль/л 4-хлорфенола, 0,25 ммоль/л 4-аминоантипирина, 4,5 ммоль/л ионов магния, 2 ммоль/л АТФ, липазы ($\geq 1,3$ Ед/л), пероксидазы ($\geq 0,5$ Ед/л), глицеролкиназы ($\geq 0,4$ Ед/л), глицерол-3-фосфатоксидазы ($\geq 1,5$ Ед/л).

2. Стандартный раствор триацилглицеринов (2,28 ммоль/л).

Ход работы.

К 10 мкл исследуемой сыворотки крови добавляют 1 мл рабочего реагента, тщательно перемешивают и инкубируют 10 мин при комнатной температуре. После инкубации пробу фотометрируют при 500 нм против контрольного образца, состоящего исключительно из компонентов рабочего реагента. Стандартную пробу готовят аналогичным образом, заменяя в ее составе 10 мкл сыворотки крови на 10 мкл стандартного раствора триацилглицеринов.

Расчет концентрации ТГ проводили по формуле:

$$C_{\text{ТГ}} (\text{ммоль/л}) = 2,28 \times A \text{ пробы} / A \text{ стандарта.}$$

1.4.4. Расчет концентраций ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП

ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП рассчитывают по формулам на основании уже полученных данных.

Концентрацию холестерина липопротеинов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) и холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) рассчитывают по формулам:

$$\text{ХС ЛПОНП} = \text{ТГ} / 2,2;$$

$$\text{ХС ЛПНП} = \text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП} - \text{ТГ} / 2,2;$$

где ОХС – общий холестерин, ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, ТГ – триацилглицерины.

3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

3.1. Перечень контрольных мероприятий управляемой самостоятельной работы студентов.

Для получения оценки по УСР студент должен подготовить реферат, написать 1 контрольная работа, состоящая из тестов и задач.

3.2. Методика формирования оценки

Учебным планом II ступени получения высшего образования для студентов специальности 1-31 80 11 «Биохимия» в качестве формы итогового контроля по учебной дисциплине рекомендован экзамен.

Студент допускается к сдаче экзамена по учебной дисциплине в случае отработки всех практических занятий, написания реферата и получения положительных оценок по контрольным работам.

Формирование оценки за текущую успеваемость:

$$\text{итоговая оценка} = A \times 0,4 + B \times 0,6,$$

где А – средний балл по лабораторным занятиям и УСР, В – экзаменационный балл.

Итоговая оценка выставляется только в случае успешной сдачи экзамена (4 балла и выше).

3.3. Темы рефератов

1. Принципы световой микроскопии. Строение светового микроскопа.
2. Принципы микроскопии. Классификация видов микроскопии.
3. Оптическая микроскопия
4. Флюоресцентная микроскопия
5. Рентгеновская микроскопия
6. Растровая электронная микроскопия
7. Просвечивающая электронная микроскопия
8. Сканирующая зондовая микроскопия: принцип, классификация.
9. Атомно-силовая микроскопия
10. Туннельная микроскопия
11. Перечислите и кратко охарактеризуйте основные оптические методы исследования биологических веществ.
12. Спектрофотометрические методы исследования веществ.
13. Перечислите и кратко охарактеризуйте основные электрохимические методы исследования биологических веществ.
14. Метод электрофореза: основы методы, виды электрофоретического разделения макромолекул (нативный/денатурирующий, горизонтальный/вертикальный и т.д.).

15. Методы блоттинга: типы и основы методов. Области применения.
16. Иммуноэлектрофорез: разновидности и области применения.
17. Основы хроматографического разделения макромолекул. Основные характеристики: селективность, разрешающая способность и т.д. Виды хроматографии.
18. Ионообменная хроматография.
19. Гель-фильтрация.
20. Планарная хроматография.
21. Аффинная хроматография.
22. Адсорбционная хроматография.
23. Основные принципы масс-спектрометрии.
24. Способы ионизации макромолекул при проведении массспектрометрии.
25. Типы масс-анализаторов: классификация, принципиальная схема разделения.
26. Секвенирование методом лигирования.
27. Технология SmartFlare для анализа экспрессии генов.
28. Методы анализа метилома: краткая характеристика.
29. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов: метилирование ДНК.
30. Бисульфитная модификация и секвенирование.
31. Метил-чувствительная ПЦР.
32. Флюоресцентные красители: области применения
33. Высокоэффективная жидкостная хроматография: особенности, области применения
34. Общая характеристика метода проточной цитометрии.
35. Рефрактометрия: основа метода и области применения.

3.4. Примеры тестов и задач

Тесты

1. Оптимальным антикоагулянтом при определении показателей кислотно-основного равновесия является:
 - А. оксалат
 - Б. цитрат
 - В. литиевая соль гепарина
 - Г. натриевая соль гепарина
 - Д. ЭДТА

2. Ацидоз, как правило, сопровождается:
 - А. гипокалиемией
 - Б. гиперкалиемией
 - В. гипернатриемией
 - Г. нормокалиемией

3. В лабораторной практике при исследовании уровня гликемии фторид натрия используется

- А. для стимуляции гликолиза
- Б. для предотвращения гликолиза
- В. в качестве антикоагулянта
- Г. для связывания HbA1

1. Увеличение активности γ – глутамилтранспептидазы в сыворотке преимущественно наблюдается при:

- А. простатите
- Б. гастрите
- В. панкреатите
- Г. холестаза
- Д. гломерулонефрите

2. К лабораторным показателям, используемым в диагностике причин гиперкалиемии, относятся все, кроме:

- А. мочевины и электролитов крови
- Б. показателей кислотно-основного равновесия
- В. уровня гликемии
- Г. содержания конъюгированного билирубина

Задачи

1. Рассчитать коэффициент насыщения трансферрина железом, если концентрация сывороточного железа составляет 21,5 мкмоль/л, а содержание трансферрина – 2,7 г/л.

2. В клинику обратилась молодая женщина с жалобами на нарастающую острую боль в суставах, усиливающуюся при малейших пассивных и активных движениях, отечность мягких тканей в области суставов. Параллельно с этим, отмечаются неприятные ощущения в области сердца, легкая одышка при нагрузках.

Постановка коагуляционной ленты Вельтмана показала наличие коагуляции только в пробирках №1 и №2. О чем это может свидетельствовать?

3. В моче у спортсмена-биатлониста, недавно вернувшегося с соревнований в г. Анси, фиксируется появление белка (суточная потеря составляет около 0,9 г). Объясните возможную причину протеинурии.

3.5. Вопросы для подготовки к экзамену

- 1. Основные оптические методы исследования биологических веществ.
- 2. Спектрофотометрические методы исследования веществ.
- 3. Перечислите и кратко охарактеризуйте основные электрохимические методы исследования биологических веществ.

4. Метод электрофореза: основы методы, виды электрофоретического разделения макромолекул (нативный/денатурирующий, горизонтальный/вертикальный и т.д.).
5. Методы блоттинга: типы и основы методов. Области применения.
6. Иммуноэлектрофорез: разновидности и области применения.
7. Основы хроматографического разделения макромолекул. Основные характеристики: селективность, разрешающая способность и т.д. Виды хроматографии.
8. Ионообменная хроматография.
9. Гель-фильтрация.
10. Планарная хроматография.
11. Аффинная хроматография.
12. Адсорбционная хроматография.
13. Основные принципы масс-спектрометрии.
14. Способы ионизации макромолекул при проведении массспектрометрии.
15. Типы масс-анализаторов: классификация, принципиальная схема разделения.
16. Способы подготовки белковых фракций для массспектрометрического анализа.
17. Методы секвенирования: "классические" и нового поколения.
18. Метод ПЦР: основы и разновидности.
19. ПЦР в реальном времени: отличия от классической ПЦР. Методы детекции флуоресценции (типы гибридных зондов).
20. Секвенирование по Максаму-Гилберту.
21. Секвенирование по Сэнгеру.
22. Пиросеквенирование.
23. Методы подготовки библиотек для секвенирования нового поколения.
24. Секвенирование методом лигирования. Полупроводниковое секвенирование.
25. Методы анализа метилома: краткая характеристика.
26. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов: метилирование ДНК.
27. Бисульфитная модификация и секвенирование.
28. Флуоресцентные красители: области применения
29. Высокоэффективная жидкостная хроматография: особенности, области применения
30. Общая характеристика метода проточной цитометрии.
31. Рефрактометрия: основа метода и области применения.
32. Ферменты – маркеры поражения определенных органов: аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, креатинкиназа.
33. Ферменты – маркеры поражения определенных органов: лактатдегидрогеназа, панкреатическая амилаза, щелочная фосфатаза.
34. Биохимические основы диагностики заболеваний почек.

35. Биохимические основы диагностики заболеваний печени.
36. Биохимические основы диагностики заболеваний желудочнокишечного тракта.
37. Биохимические основы диагностики заболеваний эндокринной системы.
38. Пренатальная диагностика наследственных болезней.
39. Роль свободно-радикальных процессов в норме и при патологии.
40. Роль эндотелия сосудов в норме.
41. Показатели гемостаза при различных заболеваниях.
42. Эндотоксикоз. Биохимические показатели эндотоксикоза.
43. Пищевая ценность продуктов.
44. Лечебные диеты при различных заболеваниях и их биохимическое обоснование.
45. Построение режима питания с учетом израсходованной энергии.
46. Исследование состава таблетированных, порошковых, растительных наркотических веществ.
47. Методы подготовки биологических объектов для исследования.
48. Методы исследования биологических следов на вещественных доказательствах. Методы исследования отпечатков пальцев.
49. Методы подготовки образцов биологических жидкостей к исследованию. Качественные методы обнаружения наркотических и сильнодействующих веществ в биологических жидкостях.
40. Основные принципы масс-спектрометрии. Способы ионизации макромолекул при проведении масс-спектрометрии.

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

4.1. Рекомендуемая литература.

Основная

1. Д.А. Новиков. Фармацевтическая биохимия. Курс лекций / учебное пособие. – Мн.: Издательский центр БГУ, 2018. – 343с.
2. Федюкович Н.И., Рубан Э.Д. Фармакология. М.: Издательство: Феникс, 2021. – 708 с.
3. Моисеев Д.В., Лукашов Р.И., Веремчук О.А. Фармацевтическая биохимия / учебное пособие. – Вт.: Издательский центр УО «Витебский государственный медицинский университет», 2019. – 292 с.

Дополнительная

4. Уилсон, К. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии: учеб. пособие / К. Уилсон, Д. Уолкер. — Электрон. дан. — Москва: Издательство "Лаборатория знаний", 2015. — 855 с.
5. Биохимические основы жизнедеятельности человека: учеб. пособие для студентов ВУЗов / Ю.Б. Филиппович, А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова, Н.М. Кутузова. – М.: ВЛАДОС, 2005 – 407с.
6. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для высш. пед.учеб. Заведений/ Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – 3-е изд., стер. – М.: Академия, 2006 –208с.
7. Камышников, В.С. Клиническая лабораторная диагностика. Методы и трактовка лабораторных исследований: учебное пособие /В.С. Камышников. – Минск: МЕДпресс-информ, 2015. – 720 с.
8. Трегубов С.Н. Основы уголовной техники. Научно-технические приемы расследования преступлений. Практическое руководство для судебных деятелей. Петроград: издание юридического книжного склада «Право», 1915.
9. Кишкун, А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики /А.А. Кишкун. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 760 с.
10. Хиггинск, К. Расшифровка клинических лабораторных анализов / К. Хиггинск. – Москва: Лаборатория знаний, 2016. – 589 с.
11. Биохимия: справочник студента-биохимика /сост. Т.А. Кукулянская, Н.
12. Щербак, С.Г. Клиническая интерпретация лабораторных исследований для практикующего врача: учебно-методическое пособие / С.Г. Щербак. - Москва: Корона - Век, 2015. – 464 с.
13. Биохимия: Учебник для институтов физической культуры/ Под ред. В.В. Меньшикова, Н.И. Волкова. - М.: Физкультура и спорт, 1986. – 384 с.
14. Рогозкин В.А. Биохимическая диагностика в спорте. – Л.: Наука, 1988. – 50 с.

15. Меньшутина Н. В. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. /Меньшутина Н. В., Алвес С. В., Мишина Ю. В. / Том 1-2. - М.: Издательство: Бином, 2016.
16. Физиологическое тестирование спортсменов высокого класса/ Под ред. Дж. Дункана МакДауэла, Говарда Э. Уэнгера, Говарда Дж. Грина. – Киев: Олимпийская литература,1998. – 430 с.
17. Хмелевский Ю.В., Усатенко О.К. Основные биохимические константы в норме и при патологии. – Киев: Здоров'я, 1984. – 120 с.
18. Брухман Э.Э. Прикладная биохимия / Э.Э. Брухман. М: Наука. 1981.
19. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул изоэлектрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л.А. Остерман. М.: Наука,1983.
20. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман. М.: Наука,1981.
21. Остерман Л.А.Хроматографические методы исследования / Л.А. Остерман. М.: Наука. 1985.

4.2. Электронные ресурсы

1. Учебная программа учреждения высшего образования по учебной дисциплине «Прикладная биохимия» для специальности 1-31 80 11 Биохимия [Электронный ресурс] / БГУ, факультет биологии. – Режим доступа: http://bio.bsu.by/biohim/kursy_mag3.html – Дата доступа: 21.03.2022.
2. Прикладная биохимия: презентации лекций [Электронный ресурс] / БГУ, факультет биологии. – Режим доступа: http://bio.bsu.by/biohim/kursy_mag3.html – Дата доступа: 21.03.2022.
3. Биохимия: справочник студента /сост. Кукулянская Т.А., Орел Н.М. – Минск: БГУ, 2011. – 83 с. [Электронный ресурс] / БГУ, электронная библиотека. - Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/25799> – Дата доступа: 21.03.2022.