

Федеральное агентство по здравоохранению и социальному развитию  
ГОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия»

*Серия «Научная конференция»*

# **АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ СОВРЕМЕННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**

**МАТЕРИАЛЫ  
МЕЖРЕГИОНАЛЬНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ**

*27–28 октября 2010 года*

Ижевск  
ИГМА  
2010

УДК 616.31(063)

ББК 56.6я43

А 568

Редакционная коллегия:

проф. Л.С. Исакова (гл. редактор); проф. И.Г. Брындина;  
доц. Е.В. Елисеева, доц. А.А. Пермяков, доц. Х.В. Гурфинкель

Актуальные вопросы современной физиологии и медицины:  
А 568 материалы межрегиональной научно-практической конференции. 27-28 октября 2010 года. – Ижевск, 2010. – 176 с. – (Серия «Научная конференция»).

ISBN 978-5-91385-065-2

Конференция посвящена 80-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ и УР, доктора медицинских наук, профессора Георгия Ефимовича Данилова. Вся его жизнь была неразрывно связана с Ижевским государственным медицинским институтом (ныне академия), где он проработал более полувека, пройдя путь от студента до ректора. В 2009 году исполнилось 75 лет кафедре нормальной физиологии, которой он заведовал 22 года.

В сборнике опубликованы научные работы сотрудников ИГМА и других медицинских вузов РФ и ближнего зарубежья, а также врачей практического здравоохранения. Освещены актуальные вопросы теоретической и практической медицины, а также вопросы преподавания и организации здравоохранения в современных условиях.

Издание рассчитано на научных работников, врачей практического здравоохранения, а также студентов медицинских вузов.

УДК 616.31(063)

ББК 56.6я43

ISBN 978-5-91385-065-2

© ГОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», 2010

© Редакционная коллегия, составление, 2010

## ХОЛЕСТЕРИНОВЫЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ПЛАНАРНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

В последние десятилетия внимание многих исследователей привлекают биосенсоры – устройства, в конструкции которых сочетаются аналитические свойства биологических и физических процессов. В общем виде биосенсор состоит из биологического преобразователя (биотрансдюсера) и физического преобразователя, формирующего электрический сигнал. Распространенным биотрансдюсером служат ферменты, иммобилизованные на разнообразных носителях. Задача таких биосенсоров состоит в специфичном и быстром определении биомолекул-субстратов (Э. Тёрнер, И. Карубе, Дж. Уилсон, 1992).

Широко применяется в клинических лабораториях энзиматический фотоколориметрический метод (ЭФМ) определения холестерина (Г.Е. Яковлева, 2005). Определение холестерина и его эфиров основано на применении системы ферментов, включающей холестеролоксидазу (ХО) (ЕС 1.1.3.6), холестеролэстеразу (ХЭ) (ЕС 3.1.1.13) и пероксидазу (ЕС 1.11.1.7). Принцип метода основан на разложении эфиров холестерина ХЭ с последующим окислением холестерина ХО кислородом воздуха с образованием перекиси водорода. Последняя расщепляется пероксидазой, окисляя хромоген до окрашенного продукта (М.А. Pesce, S. H. Bodourian, 1976).

Холестериновый энзиматический биосенсор (ХЭБ), созданный на базе такой системы способен существенно оптимизировать измерение холестерина в биологических жидкостях, обеспечивая ускорение анализа и снижая его себестоимость.

Целью настоящей работы стала апробация метода создания амперометрического холестеринового энзиматического биосенсора (ХЭБ), биотрансдюсером в котором выступает система холестеролоксидаза/пероксидаза иммобилизованная на поверхности планарного электрода, изготовленного методом трафаретной печати (ООО «РУСЕНС», Москва, МГУ). Рабочий и вспомогательный электрод состоят из графитовой пасты, электрод сравнения – хлорсеребряный. Сопротивление 10–30 Ом. Размеры электрода 10×28×0,35 мм.

В качестве источника ферментов использовали раствор ферментов из набора для определения холестерина в сыворотке «Витал Диагностик СПб», включающий холестеролоксидазу (250 У/л) и пероксидазу (500 У/л). Ферментный раствор объемом 2 мкл. наносили на поверхность рабочего электрода и оставляли на 10-12 час при 4°C для иммобилизации ферментов. Затем поверхность электрода трехкратно отмывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР). Измерения силы тока проводили с помощью потенциостата.

Первоначально был исследован ответ ХЭБ на различные концентрации перекиси водорода ( $1 \times 10^{-4}$  М;  $2 \times 10^{-4}$  М;  $4 \times 10^{-4}$  М;  $6 \times 10^{-4}$  М). В качестве контроля был использован ЗФР, показатели силы тока для которого служили нулевыми. Для каждой концентрации проводили трехкратное измерение силы тока в течение 30-ти секунд (до установления стабильной величины силы тока).

Анализ кривых «сила тока/время» для различных концентраций перекиси водорода показал наиболее выраженные различия токов на временном интервале 3-7 секунд. На этом отрезке времени наблюдаемая зависимость «сила тока/концентрация» является обратной (0,0001 М – 0,226 мкА; 0,0002 М – 0,182 мкА; 0,0004 М – 0,159 мкА; 0,0006 М – 0,096 мкА.) и обнаруживает высокую достоверность аппроксимации при приведении к линейной зависимости ( $R^2 = 0,9581$ ). Полученная зависимость подтверждает иммобилизацию пероксидазы на поверхности электрода и сохранение её активности.

Во второй серии измерений исследовались изменения силы тока в ответ на различные концентрации холестерина. Исходный раствор  $6 \times 10^{-3}$  М разбавляли ЗФР до концентраций  $4 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-4}$ ;  $6 \times 10^{-4}$  М. Анализ кинетических кривых «сила тока/время» для различных концентраций проводили на временном интервале 3-7 секунд. Зависимость «сила тока/концентрация» также оказалась обратной:  $4 \times 10^{-4}$  М – 0,212 мкА;  $5 \times 10^{-4}$  М – 0,102 мкА;  $6 \times 10^{-4}$  М – 0,041 мкА. При приведении зависимости «сила тока/концентрация» к линейной наблюдалась высокая степень достоверности аппроксимации ( $R^2 = 0,9734$ ).

Время одного анализа, проводимого с помощью ХЭБ составляет 30–40 секунд, в то время как ЭФМ требует не менее 15–20 минут. Система «электрод-ферменты» при хранении во влажной камере (при 4°C)

сохраняет аналитические свойства до 1,5 месяцев, выдерживая порядка 600 циклов измерений. Многократное использование малого количества ферментного раствора (2 мкл против 2 мл) существенно удешевляет процедуру анализа.

Таким образом, показана возможность создания и использования энзиматического биосенсора для определения холестерина путем сорбционной иммобилизации на поверхности планарных печатных графитовых электродов нескольких ферментов. Предложенная схема создания энзиматических биосенсоров является технологически доступной и экономически эффективной.

Н.Н. Чучкова<sup>1</sup>, Н.В. Кормилиная<sup>2</sup>, П.В. Смирнов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ижевская государственная медицинская академия, Ижевск

<sup>2</sup> Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

## К ОЦЕНКЕ БЕЛОКСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ ТИМУСА ПРИ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

В ходе развития атеросклероза наблюдаются системные иммунные сдвиги, обусловленные дисбалансом активности клеток лимфоидной ткани. Наиболее существенно изменяется тимусзависимое звено иммунной системы – в периферической крови достоверно снижается количество CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, сочетающееся со снижением их активности. В созревании и дифференцировке тимусзависимых лимфоцитов ответственно микроокружение, создаваемое клетками вилочковой железы. К таким клетками относятся, в том числе, и макрофаги (МФ) тимуса.

В связи с вышеизложенным мы поставили целью изучить морфофункциональные особенности популяции МФ вилочковой железы крыс, находящихся на гиперхолестериновой диете (К.А.Мещерская, 1964). Для оценки белоксинтезирующего аппарата МФ нами был выбран метод определения активности ядрышковых организаторов (ЯОР) *J. Crocker* (1990).

В контрольной группе крыс количество активных ядрышек МФ в корковом веществе тимуса составляет большинство – 84,12%. Среди них на долю основных (классических) типов нуклеолонемных и компактных (Н и К) приходится (61,38%), а переходных форм нуклеолонемно-компактных (НК) – 22,77%. Неактивные формы ЯД (15,84%), представлены кольцевидными (КЛ) (5,67%) ЯД и микроя-