

<i>HP</i>		
Генотип	Количество человек	Встречаемость генотипа в %
<i>Hp</i> 1-1	56	15,2
<i>Hp</i> 2-1	152	41,2
<i>Hp</i> 2-2	161	43,6
Σ	369	100

Частота встречаемости аллели *Hp*¹ составила 35,7 %. Данный показатель практически совпадает с таковым по Европе, в частности по Восточной Европе (37–39 %) [2]. В то же время выявлено повышение встречаемости неблагоприятного генотипа *Hp* 2-2. Он характеризуется значительным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, включая инфаркт миокарда и атеросклеротические изменения сосудов. Несмотря на то, что сердечно-сосудистые заболевания по природе являются мультифакториальными, само наличие этого генотипа должно рассматриваться как один из факторов риска. В сочетании с нерациональным питанием и неадекватной физической нагрузкой наследственные факторы могут привести к тяжелым формам атеросклероза, инфаркта миокарда.

Выводы. При последующем исследовании планируется расширить выборку и обратить внимание на структуру выборки. Полученную схему ПЦР предполагается использовать для детекции полиморфизма гена гаптоглобина и для изучения его ассоциации с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, выявления групп риска среди лиц с повышенной предрасположенностью к развитию осложнений атеросклероза, а также произвести усовершенствование методики для получения возможности определения полиморфизма с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Литература

- 1 Langlois, M. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans / M. Langlois, J. Delanghe // *Clinical Chemistry*. – 1996 – Vol. 42, № 10. – P. 1589–1600.
- 2 Wobeto, V. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance / V. Wobeto, T. Zaccariotto, M. Sonati // *Genetics and Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 31, № 3. – P. 602–620.
- 3 Ахметов, И. Молекулярная генетика спорта: монография / И. Ахметов. – М.: Советский спорт, 2009. – 268 с.
- 4 Genotyping of the Common Haptoglobin *Hp* 1/2 Polymorphism Based on PCR / W. Koch [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2002 – Vol. 48, № 9. – P. 1377–1382.

Svirid A. V.¹, Sinelyov V. A.², Babenko A. S.²

HAPTOGLOBIN GENE (*HP*) ALLELIC POLYMORPHISM STUDY

¹*International Sakharov Environmental University, Minsk*

²*Institute of bioorganic chemistry, National Academy of Sciences, Minsk*

Summary

PCR based method of haptoglobin gene 1,2 polymorphism detection was optimized. 369 belarussian healthy individuals were genotyped and genotyping results were discussed. Described method can be used in cardiovascular diseases risk factors revealing.

УДК 577.152.18

Чеушева М. В., Флорик Е. А.

ПЕРОКСИДАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ АМИНОВ И ТИОЛОВ

Белорусский государственный технологический университет, Минск

Введение. Пероксидаза – один из самых распространенных ферментов, интерес к изучению, которого с годами не ослабевает. Повсеместное присутствие этого фермента в растительных и животных тканях дает основание считать его жизненно важным соединением высших и низших организмов. В свойствах и действии различных пероксидаз много общего, хотя и имеются некоторые специфические особенности в отдельных стадиях катализируемых ими процессов [1]. *Цель исследования* – изучение кинетики реакции пероксидазного окисления аминов и тиолов.

Материалы и методы исследования. В работе использовали пероксидазу хрена («Реахим», Россия) со спектральным показателем чистоты $E_{403}/E_{278} = RZ = 0,45$. Концентрированные растворы пероксидазы окрашены в коричневый цвет и имеют характерные полосы поглощения при 403, 498, 548, 583 и 640 нм. Наиболее интенсивная полоса наблюдается при 403 нм (полоса Core) [2]. Поэтому концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при $\lambda = 403$ нм ($\epsilon = 10,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Концентрацию пероксида водорода («Реахим», Россия) определяли спектрофотометрически при $\lambda = 230$ нм ($\epsilon = 72,7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [3].

Раствор β -меркаптоэтанола – 2,0 мкл β -меркаптоэтанола вносили в 10,0 см³ бидистиллированной воды.

Раствор дитиозритритола (ДЭТ) – 1,5 мг ДЭТ растворяли в 10,0 см³ бидистиллированной воды.

Раствор дитиотрептола (ДТТ) – 1,5 мг ДТТ растворяли в 10,0 см³ бидистиллированной воды.

Растворы о-дианизидина марки «ч» («Реахим», Россия) очищали двукратной возгонкой в вакууме и готовили растворы необходимых концентраций в этаноле по навеске.

Реакции окисления о-дианизидина перекисью водорода проводили при 20°C в физиологическом растворе.

В кварцевую кювету ($l = 1,0$ см) последовательно вносили 2,0 см³ физиологического раствора (0,1 мМ), 0,1 см³ спиртового раствора о-дианизидина и 0,3 см³ раствора пероксидазы. Реакцию инициировали добавлением 0,1 см³ перекиси водорода. Кинетические кривые регистрировали при непрерывном перемешивании на спектрофотометре SPECORD M40 (Carl Zeiss, ГДР) по изменению экстинкции при 460 нм ($\epsilon = 3,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [4].

При изучении влияния тиолов на скорость протекания реакции в кварцевую кювету вносили 0,1 см³ раствора β -меркаптоэтанола, ДТТ или ДЭТ определенной концентрации.

Спектрофотометрические определения скорости реакции окисления β -меркаптоэтанола проводили следующим образом: в кварцевую кювету ($l = 1$ см) последовательно вносили 2,5 см³ раствора β -меркаптоэтанола и 0,005 см³ раствора пероксидазы. Реакцию запускали добавлением 0,18 см³ пероксида водорода. Кинетические кривые регистрировали при непрерывном перемешивании на спектрофотометре по изменению экстинкции при 230 нм.

Начальные скорости реакции определяли как тангенс угла наклона касательной к началу кинетической кривой. Расчет проводили с помощью пакета программ Kinetiks спектрофотометра SPECORD M40 (Carl Zeiss, ГДР).

Результаты исследования и их обсуждение. Активность пероксидаз зависит от концентрации фермента и субстрата, величины pH и температуры, поэтому вначале необходимо было определить оптимальные условия проведения ферментативной реакции по каждому из этих параметров.

В ходе исследований были установлены зависимости пероксидазной активности окисления о-дианизидина от концентраций фермента, пероксида водорода, о-дианизидина и величины pH. Все реакции проводили при 20 °C.

Установленные оптимальные параметры определения скорости реакции пероксидазного окисления о-дианизидина приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Параметры ферментативной реакции окисления о-дианизидина

Субстрат пероксидазного окисления	Концентрация белка, мкМ	Концентрация окисляемого субстрата, мкМ	Концентрация пероксида водорода, мМ	pH
о-Дианизидин	0,11-0,14	0,08-0,09	0,03-0,07	6,0-8,0

Далее определяли зависимости начальных скоростей реакции пероксидазного окисления о-дианизидина от концентраций β -меркаптоэтанола, ДЭТ и ДТТ. Были установлены концентрации тиолов, при которых скорости реакций ингибировались на 50 % ($I_{50\%}$). Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Концентрации тиолов, ингибирующие реакцию окисления о-дианизидина на 50%

Тиол	$I_{50\%}$, мкМ
β -меркаптоэтанол	8,0
ДЭТ	3,0
ДТТ	4,0

При изучении зависимости скорости пероксидазного окисления β -меркаптоэтанола от pH среды установили, что максимальная скорость окисления наблюдается в области pH от 9,0 до 10,0.

Выводы. Так как активность пероксидаз зависит от концентраций фермента и субстратов в зоне реакции и величины pH, были установлены зависимости скоростей реакций пероксидазного окисления о-дианизидина от концентраций фермента и тиолов в зоне реакции, а также величины pH. Исходя из полученных зависимостей определены оптимальные условия проведения реакций (pH 6,0–8,0; $C_{H_2O_2} = 0,03\text{--}0,07$ мМ; $C_{\text{о-диан}} = 0,08\text{--}0,09$ мкМ; $C_{\text{белка}} = 0,11\text{--}0,14$ мкМ).

Установлено ингибирующее действие тиолов на пероксидазное окисление амина (о-дианизидина). Показано, что по своей ингибирующей активности изученные тиолы можно расположить в следующий ряд: ДЭТ (3,0 мкМ) > ДТТ (4,0 мкМ) > β -меркаптоэтанол (8,0 мкМ).

Литература

1. Александрова, Е. Ю. Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и ее стабильность к различным воздействиям / Е. Ю. Александрова, М. А. Орлова, П. Л. Нейман // Вестн. моск. ун-та. – 2006. – Т. 47, № 5. – С. 350–352.
2. Иванова, Т. М. О природе фенолоксидазного действия пероксидазы / Т. М. Иванова, Б. А. Рубин // Биохимия. – 1962. – Т. 27, № 4. – С. 622–630.
3. Кершенгольц, Б.М. Исследование некоторых свойств пероксидазы из хрена в растворимом и иммобилизованном состоянии: автореф. дис. ... канд. хим. наук / Б.М. Кершенгольц; Моск. гос. ун-т им. М. В. Ломоносова. – М., 1997. – 32 с.
4. Лебедева, О. В. Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена / О. В. Лебедева, Н. Н. Угарова, И. В. Березин // Биохимия. – 1977. – Т. 42, № 8. – С. 1372–1379.

Cheushava M. V., Flyurik E. A.

PEROXIDASE OXIDATION OF AMINES AND THIOLS

Belarusian State Technological University, Minsk

Summary

The dependence of the reaction rate of the peroxidase oxidation of o-dianizidin on the concentrations of enzyme and substrates in the reaction zone, as well as the pH value are established. The optimum reaction conditions are determined.

The inhibitory effect of thiols on the peroxidase oxidation of amine (o-dianizidin) is found out. It is shown that, examined thiols can be arranged in the following line by its inhibitory activity: DET (3,0 mM) > DTT (4,0 mM) > β -mercaptoethanol (8,0 mM).

УДК: 619: 578.825.1:57.083.224

Чаплыго К.Э., Бабак В.А.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДЕЛЕЦИОННОГО ПО GE ШТАММА ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ КМИЭВ-V106А СУСПЕНЗИОННЫМ СПОСОБОМ В БИОРЕАКТОРЕ *Институт экспериментальной ветеринарии НАН Беларуси, Минск*

ВВЕДЕНИЕ

В вирусологии для репродукции вирусов используют 3 типа системы-хозяин: культура клеток, развивающиеся куриные эмбрионы, восприимчивые животные. При этом применение культур клеток является более целесообразным, так как позволяет получать количественно неограниченное вирусное сырье высокого качества, легко поддающееся стандартизации и контролю.

Различают два способа культивирования клеток и вирусов: выращивание на поверхности твердой фазы в виде монослоя (стационарный, роллерный), а также глубинное культивирование, при котором клетки размножаются в виде суспензии (суспензионный). При суспензионном способе культивирования, вокруг растущих клеток производится непрерывное обновление питательной среды и газовой смеси, что обеспечивает их полноценное питание и размножение, тем самым создает оптимальные условия для репродукции вируса [2].

Разработка и внедрение суспензионного способа культивирования клеток и вирусов является перспективной, т.к. дает возможность получения стандартных партий высокоактивного вирусологического материала в полупромышленных объемах.

Цель: отработка параметров суспензионного культивирования делеционного по gE штамма вируса болезни Ауески КМИЭВ-V106А.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Накопление вирусной биомассы проводили в перевиваемой культуре клеток ВНК-21(с-13). Для проведения опыта использовали лабораторную модель биореактора BioFlo 110.

Культивирование клеток, для первоначальной загрузки биореактора, осуществляли роллерным способом с применением параметров: t - +37°C, pH 7,0-7,2, посевная концентрация - 10-15 млн. кл/рол, питательная среда - ФГМС/ДМЕМ или ГЛА/ГЕМ/ДМЕМ, скорость вращения роллеров - 0,5-0,7 об/мин, цикл роста - 5-7 суток. По окончании цикла культивирования, из роллеров, с сформированным клеточным монослоем, сливали питательную среду, и производили отстойку клеток от стекла с помощью раствора версен/трипсин (3:1). Отслоившиеся клетки ресуспензировали в свежую питательную