

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

**БИОХИМИЯ
И МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ**

**BIOCHEMISTRY
AND MOLECULAR
BIOLOGY**

Выпуск 4

*Сборник статей, посвященный 95-летию основателя
Института биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси академика Ю. М. Островского*

*Collection of articles dedicated to the 95th anniversary of the founder
of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds National Academy
of Sciences of Belarus academician Yu. M. Ostrovsky*

Минск
ИВЦ «Минфина»
2020

Настоящий выпуск сборника статей «Биохимия и молекулярная биология» посвящен 95-летию со дня рождения выдающегося белорусского ученого, основателя Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси академика Ю.М. Островского. В сборнике представлены результаты экспериментальных и клинических исследований по изучению влияния биологически активных веществ на метаболические реакции и физиологические процессы в норме и при различных нарушениях жизнедеятельности, фундаментальных и прикладных проблем витаминологии, биохимической фармакологии, молекулярной биологии и биофизики, биохимических аспектов исследования алкоголизма.

Сборник адресован научным работникам, преподавателям высших учебных заведений, аспирантам, студентам, практическим врачам и другим специалистам, изучающим современные проблемы биохимии, биофизики, молекулярной биологии, физиологии и фармакологии.

Рекомендовано к изданию ученым советом республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» (протокол № 6 от 20 ноября 2020 г.).

Редакционная коллегия:

Семененя И. Н., доктор медицинских наук, профессор (главный редактор)
Семенович Д. С., кандидат биологических наук (заместитель главного редактора)
Буко В. У., доктор биологических наук, профессор
Заводник И. Б., доктор биологических наук, профессор
Зиматкин С. М., доктор биологических наук, профессор
Канунникова Н. П., доктор биологических наук, профессор
Лелевич В. В., доктор медицинских наук, профессор
Мойсеёнок А. Г., доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси
Нефёдов Л. И., доктор медицинских наук, профессор
Островский А. А., доктор медицинских наук, профессор
Разводовский Ю. Е.
Сутько И. П., кандидат биологических наук
Черникевич И. П., доктор химических наук, профессор
Шейбак В. М., доктор медицинских наук, профессор

Рецензенты:

Бушма М. И., доктор медицинских наук, профессор
Макарчиков А. Ф., доктор биологических наук, доцент

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	6
-------------------	---

ПАМЯТИ Ю. М. ОСТРОВСКОГО

Лелевич В.В.

Ю.М. ОСТРОВСКИЙ — ЯРКИЙ УЧЕНЫЙ, МУДРЫЙ ПЕДАГОГ, ТАЛАНТЛИВЫЙ ОРГАНИЗАТОР ... 8

Чиркин А. А.

БЕЛОРУССКИЙ БИОХИМИК И ПУБЛИЦИСТ АКАДЕМИК Ю.М. ОСТРОВСКИЙ 14

НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

Агейко С.А., Степура И.И., Степура В.И., Травкина М., Янцевич А.В.

ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТА UVA ДИАПАЗОНА И ВИДИМОГО СВЕТА В ПРИСУТСТВИИ РИБОФЛАВИНА 20

Астроўскі А.А., Максімчык Ю.З., Хвесько І.С., Гурыновіч В.А., Туманаў А.В., Палубок В.Ч., Марчык А.І., Астроўская А.Б., Пракопчык М.І., Майсяёнак А.Г.

ТЭХНІЧНЫ ПРАГРЭС І НОВЫЯ ПЕРСПЕКТЫВЫ ДЛЯ ЎЗАЕМАДЗЕЙНЯ ДАНЫХ БІЯХІМІЧНЫХ І ГІСТАЛАГІЧНЫХ ДАСЛЕДВАННЯЎ 35

Бакунович А.А., Ерошенко Ю.В., Радута Е.Ф., Сидорович Е.А., Буко В.У., Островский А.А.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КВЕРЦЕТИНА И ЕГО НАНОКОМПЛЕКСА С ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ НА ГОТОВНОСТЬ РЕЦЕПТИВНОГО ЛОЖА К ПРИНЯТИЮ КОЖНОГО ТРАНСПЛАНТАТА 42

Белонувская Е.Б., Нарута Е.Е., Лукивская О.Я., Мороз В.Л., Кузьмицкая И.А.,

Ерошенко Ю.В., Кирко С.Н., Буко В.У.

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПЕЧЕНИ ПРИ ВВЕДЕНИИ КОМПЛЕКСА БЕРБЕРИНА С ПРОИЗВОДНЫМ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС 48

Билецкая Е.С., Зинчук В.В., Муравьев А.В., Гуляй И.Э., Богданович Е.Р., Трусова И.С.

УЧАСТИЕ ОЗОНА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ 54

Величко И.М., Лелевич С.В., Лелевич В.В.

НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОРЕ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КОМПЛЕКСНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ МОРФИНОМ И ЭТАНОЛОМ 58

Гусакова Е.А., Городецкая И.В.

РОЛЬ ЙОДСОДЕРЖАЩИХ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ФОРМИРОВАНИИ ГОРМОНАЛЬНОГО ОТВЕТА НА СТРЕСС У ДЕСИМПАТИЗИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ 63

Дорошенко Е.М.

ПОКАЗАТЕЛИ ФОНДА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ КРОВООБРАЩЕНИЯ 68

Дорошенко Е.М., Зулпиев С.Н.

ТКАНЕВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФОНДА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ У ИНТАКТНЫХ КРЫС 75

Ермаков В.В., Йованович Л.Н., Мойсейенок А.Г.

РОЛЬ СЕЛЕНА И ЦИНКА В КОРРЕКЦИИ НЕКОТОРЫХ ВИРУСНЫХ ПАТОЛОГИЙ 81

Зиматкин С.М.

АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА: ОТ ГИСТОХИМИИ К ПАТОГЕНЕЗУ АЛКОГОЛИЗМА 94

Зиматкина Т.И.

АНТИВИТАМИННАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ТИАМИНА 99

<i>Зинчук В.В., Балбатун О.А., Гуляй И.Э., Глуткин С.В., Жадько Д.Д., Орехов С.Д., Лепеев В.О., Борисова В.Ю., Игнатович А.А., Машкова А.Е.</i> СТРЕСС-ЛИМИТИРУЮЩИЕ И СТРЕСС-РЕАЛИЗУЮЩИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА	10
3	
<i>Ильич Т.В., Коваленя Т.А., Лапшина Е.А., Буко В.У., Заводник И.Б.</i> СТРУКТУРА, ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ, АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМПЛЕКСА ВКЛЮЧЕНИЯ КВЕРЦЕТИН-НР-β-CD	108
<i>Катковская И.Н., Лукиенко Е.П., Максимчик Ю.З., Семенович Д.С., Титко О.В., Филипович Н.А., Канунникова Н.П.</i> ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И НАРУШЕНИЙ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В КРОВИ КРЫС ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛЕНИИ, УГНЕТЕНИИ СИСТЕМЫ КОФЕРМЕНТА А И КОРРЕКЦИИ МОДУЛЯТОРАМИ БИОСИНТЕЗА ГЛУТАТИОНА И КОФЕРМЕНТА А	114
<i>Кубышин В.Л., Зиматкина Т.И.</i> ТРАНСКЕТОЛАЗА И НЕКОТОРЫЕ СУБСТРАТЫ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ В РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА ФОСФОРИБОЗИЛПИРОФОСФАТА	120
<i>Максимчик Ю.З., Рожко В.А., Черемисин А.С., Филипович Н.А., Лукиенко Е.П., Ярец Ю.И., Семененя И.Н.</i> ОЦЕНКА МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА В ПЛАЗМЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ	126
<i>Мойсейенок А.Г., Максимчик Ю.З., Мойсейенок Е.А., Хвесько И.С.</i> D-ВИТАМИНЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ	132
<i>Мороз В.Л., Белоновская Е.Б., Нарута Е.Е., Ерошенко Ю.В., Кузьмицкая И.А., Кирко С.Н., Буко В.У.</i> ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ БЕРБЕРИНА И ЕГО СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ СТЕАТОГЕПАТИТЕ У КРЫС	142
<i>Надольник Л.И., Полубок В.Ч., Лупачик С.В.</i> МАССА ТЕЛА САМЦОВ И САМОК КРЫС ПРИ УПОТРЕБЛЕНИИ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ И ДИАБЕТЕ II ТИПА: НАРУШЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ	147
<i>Нефёдов Л.И., Глазев А.А.</i> РАЗРАБОТКА ИНФУЗИОННЫХ РАСТВОРОВ НА ОСНОВЕ ВЫСОКООЧИЩЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ С ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ СОСТАВОМ	15
3	
<i>Николаева И.В., Смирнов В.Ю., Шейбак В.М.</i> ИЗМЕНЕНИЯ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МИКРОБНО-ТКАНЕВОМ КОМПЛЕКСЕ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА И ПЕЧЕНИ В ДИНАМИКЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ	157
<i>Новгородская Я.И.</i> РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПУЛА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА НА ФОНЕ МЕТИОНИНОВОЙ НАГРУЗКИ	163
<i>Пронько Т.П., Горчакова О.В.</i> ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА N1/N2 ГЕНА P2RY12 НА РАЗВИТИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КЛОПИДОГРЕЛУ У ПАЦИЕНТОВ СО СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИЕЙ НАПРЯЖЕНИЯ	168

Разводовский Ю.Е. РОЛЬ ТРИПТОФАНА В ПАТОГЕНЕЗЕ И ЛЕЧЕНИИ АЛКОГОЛИЗМА	178
Разводовский Ю.Е. ЭФФЕКТЫ АМИНОКИСЛОТНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ФОНД АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ, ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СИНДРОМЕ ОТМЕНЫ ЭТАНОЛА	183
Разводовский Ю.Е., Шляхтун А.Г., Семененя И.Н. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ПОХМЕЛЬНОГО СИНДРОМА	191
Семененя И.Н. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА	196
Смирнов В.Ю., Разводовский Ю.Е., Дорошенко Е.М., Максимович Н.Е. ВЛИЯНИЕ L-NAME НА СПЕКТР АМИНОКИСЛОТ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ ГИППОКАМПА И КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА	212
Степура И.И., Агейко С.А., Степура В.И., Янцевич А.В. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КАРБОНИЛСОДЕРЖАЩИХ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ ТИАМИНА, ОБРАЗОВАННЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И МЕТМИОГЛОБИНА	218
Туманов А.В., Островский А.А., Полубок В.Ч., Марчик А.И. ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ГОМЕОСТАЗИНА НА СТЕПЕНЬ РАЗВИТИЯ НЕФРОПАТИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ II ТИПА У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС	233
Туманов А.В., Шляхтун А.Г., Мороз В.Л., Марчик А.И., Полубок В.Ч., Островский А.А., Бакунович А.А., Ерошенко Ю.В., Семенкова Г.Н., Сорокин В.Л., Шадыро О.И. ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРОКАТЕХИНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ У КРЫС С ОСТРЫМ ВОСПАЛЕНИЕМ КОЖИ	239
Шляхтун А.Г., Радута Е.Ф., Сутько И.П., Богдевич Е.В., Каспер Е.В., Марчик А.И., Турсунходжаева Ф.М., Разводовский Ю.Е., Семененя И.Н. ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ PPAR-РЕЦЕПТОРОВ НА НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС	244
Шляхтун А.Г., Радута Е.Ф., Сутько И.П., Янкевич Н.В., Богдевич Е.В., Марчик А.И., Турсунходжаева Ф.М., Семененя И.Н. ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПЕРОКСИСОМ НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОТМЕНЕ АЛКОГОЛЯ У КРЫС	251

ПРЕДИСЛОВИЕ

Уважаемые коллеги! Вашему вниманию представляется 4-й выпуск сборника научных трудов «Биохимия и молекулярная биология». Он посвящен 95-летию выдающегося белорусского ученого-биохимика с мировым именем, талантливого организатора науки, прекрасного педагога, обаятельного и всесторонне развитого человека, академика АН БССР, заслуженного деятеля науки БССР Юрия Михайловича Островского. Академик Островский Ю.М. – основатель Отдела регуляции обмена веществ и Института биохимии АН БССР. Он подготовил 13 докторов и 73 кандидата наук. Примерами мирового признания выдающихся научных заслуг академика Островского Ю.М. могут служить следующие факты. Так, в 1986 г. в США в журнале «Alcohol» была опубликована статья Островского Ю.М. с изложением концепции о роли эндогенного этанола и ацетальдегида в патогенезе алкоголизма. Сразу после выхода этой статьи на ее отгиски поступило около 100 запросов из разных стран мира. В 1990 г. к Юрию Михайловичу официально обратился Нобелевский комитет с просьбой высказать обоснованное мнение о кандидатуре лауреата Нобелевской премии по химии 1991 года.

В основу научной деятельности созданного в 1970 г. Отдела регуляции обмена веществ АН БССР Юрием Михайловичем было положено всестороннее междисциплинарное изучение фундаментальных аспектов витаминологии и возможностей применения витаминов, их производных, а также антивитаминов в клинической практике с целью коррекции различных нарушений жизнедеятельности. По его же инициативе с 1973 г. стало разрабатываться второе «брендовое» направление – изучение биохимических аспектов действия алкоголя на организм и развития алкогольной зависимости, а также возможностей коррекции различных нарушений, вызванных злоупотреблением алкоголя. Развитие получили также аминокислотное направление, исследование биохимических аспектов опухолевого роста и некоторые другие.

Благодаря личностным и деловым качествам Юрия Михайловича уже в 1970-е годы по уровню технической оснащенности Отдел регуляции обмена веществ АН БССР не уступал аналогичным учреждениям биологического профиля АН СССР.

До последнего дня жизни (31.12.1991) Юрий Михайлович все силы отдавал Институту. К 1990-1991 гг. он превратил Институт в крупную научную организацию с численностью работников около 240 человек. После его ухода этот показатель стал неуклонно снижаться. 1990 год оказался самым плодотворным по защитам диссертаций. Тогда работниками Института было защищено 13 диссертаций – 3 докторские и 10 кандидатских. В том же году по линии Всесоюзного общества «Знание» учеными Института была прочитана 271 лекция.

Юрий Михайлович дал толчок формированию в Институте нескольких научных школ. Это школы коферментной витаминологии и нутрициологии члена-корреспондента Мойсеенка А.Г., некоферментной витаминологии профессора Виноградова В.В., экспериментальной гепатопатологии и гепатоассоциированных внепеченочных заболеваний профессора Буко В.У., нейробиохимии и нейроморфологии алкоголизма профессора Зиматкина С.М., биохимии и фармакологии аминокислот профессора Нефедова Л.И., энзимологии профессора Воскобоева А.И., биохимии злокачественного роста профессора Требухиной Р.В.

Имя академика Островского Ю.М., его преданность науке и родной стране всегда будут примером и стратегическим ориентиром в дальнейшем развитии Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси.

Директор Института биохимии
биологически активных соединений
НАН Беларуси, доктор медицинских наук,
профессор, лауреат премии НАН Беларуси

И. Н. Семененя



**ОСНОВАТЕЛЬ ИНСТИТУТА
БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НАН БЕЛАРУСИ**

**доктор медицинских наук, профессор, академик НАН Беларуси,
заслуженный деятель науки Республики Беларусь,
лауреат премии НАН Беларуси**

**Юрий Михайлович
Островский
(29.07.1925–31.12.1991)**

**Ю.М. ОСТРОВСКИЙ — ЯРКИЙ УЧЕНЫЙ, МУДРЫЙ ПЕДАГОГ,
ТАЛАНТЛИВЫЙ ОРГАНИЗАТОР**

Лелевич В.В.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. В статье представлены данные о профессиональной деятельности академика Ю.М. Островского. Отражена его роль в создании кафедры биохимии Гродненского медицинского института, Отдела регуляции обмена веществ и Института биохимии Академии наук Беларуси. Освещены основные научные направления и достижения, разрабатываемые под руководством Ю.М. Островского.

Юрий Михайлович Островский — светлая страница в белорусской истории высшего медицинского образования и биохимической науки. Он родился на белорусской земле, здесь получил высшее медицинское образование, сформировался как педагог и ученый, проявил свои феноменальные организаторские способности, создал кафедру биохимии в новом открывшемся медицинском вузе, поднял проводимые научные исследования до всесоюзного и международного уровня, организовал Отдел регуляции обмена веществ Академии наук БССР (ОРОВ), трансформированный в Институт биохимии. Жизненный и профессиональный путь Юрия Михайловича приходился на нелегкое и непростое время в истории нашей страны. Он родился в 1925 г. в Минске, где закончил школу в канун Великой Отечественной войны. Трудно сказать, что предопределило интерес Юрия Михайловича к медицине, вследствие чего он поступил в Ленинградскую военно-медицинскую академию, а затем закончил Минский медицинский институт в 1950 г. В институте под влиянием великого педагога В.А. Бандарина у Юрия Михайловича начал формироваться стойкий интерес к научно-исследовательской работе вообще и к биохимии в частности. Профессиональная деятельность Юрия Михайловича продолжалась в течение 41 года и ее условно можно разделить на два периода — витебский (1950–1959 гг.) и гродненский (1959–1991 гг.).

После окончания Минского медицинского института в 1950 г. Юрий Михайлович был направлен на работу в Полоцкую санитарно-эпидемиологическую станцию, где возглавил отдел биохимических исследований. Здесь уже стала проявляться его профессиональная активность с выраженной научной направленностью. Был расширен спектр выполняемых в отделе биохимических исследований, внедрены современные биохимические методики. Работая врачом в санитарно-эпидемиологической станции, Юрий Михайлович начал проводить исследования по изучению обмена тиамина у больных туберкулезом. Все это привело в конечном итоге к смене профессиональной деятельности, и в 1956 г. Юрий Михайлович

был приглашен профессором В.С. Шапотом на должность ассистента кафедры биохимии Витебского медицинского института. Короткий трехлетний период, в течение которого Юрий Михайлович работал на этой кафедре, был в определенном смысле судьбоносным для него. Во-первых, им была подготовлена и в 1958 г. успешно защищена кандидатская диссертация «Обмен тиамин у туберкулезных больных при медикаментозном лечении» в Институте экспериментальной медицины АН Латвийской ССР. Во-вторых, за этот трехлетний период Юрий Михайлович проявил себя как прирожденный организатор и инициативный исследователь, поэтому в 1959 г. он был рекомендован на должность заведующего кафедрой биохимии вновь созданного Гродненского медицинского института.

С 1959 г. начинается гродненский период профессиональной деятельности Ю.М. Островского, который продолжался в течение 32 лет вплоть до его кончины. Данный период подразделяется на две равные части — 16 лет Юрий Михайлович возглавлял кафедру биохимии в медицинском институте и 16 лет руководил ОРОВ АН БССР, впоследствии — Института биохимии.



Заведующий кафедрой биохимии Гродненского государственного медицинского института, профессор Ю.М. Островский

С позиции наших дней удивляешься, как быстро и эффективно решал Юрий Михайлович большое количество организационных, кадровых, методических, хозяйственных вопросов на новой создаваемой кафедре.

В июле–августе 1959 г. на должности ассистентов были зачислены: Н.К. Лукашик (г. Витебск), А.Г. Мажуль (г. Минск), А.И. Балаклеевский (г. Москва). В 1960 г. преподавательский состав кафедры дополнили А.Н. Разумович (г. Минск), Г.А. Доста (г. Гродно), Р.В. Требухина (г. Брест). С 1964 г. коллектив кафедры начал принимать в число сотрудников выпускников Гродненского мединститута и других вузов: Ф.С. Ларина, Б.П. Комарову, Э.А. Галицкого, А.Г. Мойсеёнка, В.В. Виноградова, К.А. Мандрика, Л.Н. Дворянинович, А.Н. Севостьянова, В.В. Сукристика, А.Г. Кирилюка, Б.И. Горенштейн, Д.М. Толкач [1].

Инициативный и умелый организатор Ю.М. Островский и руководимый им коллектив в короткие сроки подготовили и оснастили кафедру необходимым современным учебным и научным оборудованием, приборами и реактивами. Полноценное обучение студентов и интенсивная научно-исследовательская работа началась на кафедре уже в 1959/60 учебном году.

Ю.М. Островский прошел с коллективом путь от кандидата медицинских наук и доцента до доктора наук, профессора, затем — члена-корреспондента и академика АН БССР. Это был обаятельный, незаурядный человек, талантливый ученый, чуткий и мудрый педагог. Отдавая много времени и сил биохимии, являясь профессионалом высочайшей пробы, Юрий Михайлович находил время для поэзии, музыки, спорта, его волновали социально-политические вопросы жизни. Он никогда не был безразличен к судьбе сотрудников, всегда был готов прийти на помощь словом и делом, справедливо наказать виноватого и стать на защиту обиженного.



На лекции по биохимии для студентов Гродненского медицинского института

Высокая научная активность сотрудников определила интенсивную подготовку биохимиков-профессионалов и формирование научных подразделений, истоки которых зарождались на кафедре биохимии. С 1959 г. на кафедре функционировала клиническая биохимическая лаборатория областной больницы, которая не только отработывала методики и выполняла анализы, но и оказывала практическую подготовку врачам-лаборантам районных и городских больниц Гродненской и Брестской областей через организацию семинаров и приглашение на рабочие места. В 1964 г. на кафедре была открыта изотопная лаборатория, в которой выполняли исследования сотрудники теоретических и клинических кафедр института.

В итоге этих бурных научно-организационных событий Юрий Михайлович выполнил и в 1964 г. успешно защитил докторскую диссертацию «Обменные сдвиги при различной обеспеченности организма тиамином» в Киевском медицинском институте. К этому времени сформировалась научная тематика кафедры биохимии, которая затрагивала изучение различных аспектов обмена витамина В₁ (тиамина), включая коферментные и некоферментные функции. За четырехлетний период (1963–1967 гг.) сотрудниками кафедры было защищено 6 кандидатских диссертаций в рамках этого научного направления [2].

Результаты исследований докладывались на республиканских, всесоюзных и международных симпозиумах, конференциях и съездах (Москва, Токио, Киото, Берлин, Иена, Нью-Йорк, Бетесда, Фрайбург), публиковались в отечественных и зарубежных биохимических журналах. По инициативе Ю.М. Островского с 1966 г. на базе кафедры биологической химии ГГМИ начали проводиться Всесоюзные симпозиумы по витаминологии. Было организовано Гродненское отделение Всесоюзного биохимического общества, которое объединяло научных работни-

ков и врачей, занимающихся биохимическими исследованиями. В 1970 г. по числу членов общества было третьим по величине в СССР.

Высокая публикационная активность, приток молодых исследователей привели к организации в 1967 г. по согласованию с Министерством здравоохранения БССР на базе кафедры биохимии и ЦНИЛ Гродненского медицинского института проблемной витаминологической лаборатории. Эта лаборатория явилась первым научным структурным подразделением, трансформация и прогрессивное развитие которого привели к созданию в г. Гродно академического института. В лаборатории была подобрана и подготовлена группа биохимиков, которые сформировали штат Отдела регуляций обмена веществ АН БССР (ОРОВ), открытый в г. Гродно в 1970 г. и реорганизованный в последующем в Институт биохимии АН БССР (директор — академик Ю.М. Островский). Постановлением Президиума АН СССР № 741 от 25 июня 1969 г. были утверждены два научных направления ОРОВ: 1) изучение молекулярных механизмов действия тиаминдифосфата и роли витаминов в регуляции обмена веществ; 2) разработка научных основ применения синтетических антиметаболитов витаминов и естественных антивитаминовых факторов в медицине и ветеринарии. В 1970 г. приказом Министра здравоохранения БССР на базе кафедры была открыта лаборатория по изучению нейроморфонов (заведующий доцент — А.И. Балаклеевский), в последующем переведенная в г. Минск.



Среди сотрудников Института биохимии АН БССР

Показателем высокой научной квалификации и значимости проводимых исследований являлся целый ряд монографий, подготовленных Юрием Михайловичем: «Тиамин: избранные главы по биохимии витамина В₁» (1971 г.); «Антивитамины в экспериментальной и лечебной практике» (1973 г.); «Механизмы межвитаминовых взаимоотношений» (1973 г.); «Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты» (1974 г.). Все этапы этого поступательного развития были инициированы, научно обоснованы и организационно обеспечены Юрием Михайловичем.

Мои личные впечатления о профессоре Ю.М. Островском начали складываться с 1974 г., когда будучи студентом 2-го курса Гродненского медицинского института я начал изучать биохимию. Его лекции имели неафишируемый демократический подтекст, простоту и ясность изложения, необходимую академичность. Личное знакомство с Юрием Михайловичем состоялось осенью 1979 г., когда я в качестве преподавателя-стажера кафедры биохимии проявил интерес к алкогольной тематике, которая активно разрабатывалась в ОРОВ. В мягкой, доброжелательной форме он поинтересовался моими научными предпочтениями и направил меня

в лабораторию биохимии спиртов и альдегидов, где концентрировались исследования по изучению метаболических отклонений у крыс с различной алкогольной мотивацией. В дальнейшем при выполнении кандидатской диссертации я достаточно часто контактировал с Юрием Михайловичем, так как он являлся моим научным консультантом. В памяти остались его мягкая интеллигентность, широчайший научный кругозор, человеческая доступность. Хорошо помню его программный доклад на Всесоюзном симпозиуме «Биохимия алкоголизма», который состоялся в г. Гродно в 1980 г. На нем Юрий Михайлович изложил метаболическую концепцию генеза алкоголизма, которая вызвала большой интерес у ведущих ученых Советского Союза и за рубежом. Концепция аккумулировала результаты, полученные гродненскими биохимиками с учетом многочисленных данных зарубежных ученых. Следует отметить, что спустя 40 лет эта концепция занимает важное место в современных представлениях о биологическом компоненте алкогольной болезни.

В 1975 г. Юрий Михайлович оставляет заведование кафедрой биохимии и полностью сосредоточивается на работе в ОРОВ АН БССР. Это было связано с большой работой по строительству и введению в строй прекрасного нового корпуса, оснащением новой современной аппаратурой, созданием новых лабораторий и их штатным укомплектованием. Как следствие этого, произошло расширение тематики научных исследований отдела. Наряду с углубленным изучением механизмов каталитического действия тиаминдифосфата, роли витаминов и антивитаминов в метаболических процессах, было начато изучение витаминно-гормональных отношений, биохимических аспектов онкологии, механизмов регуляции метаболической активности тиамина. Вследствие этого в 1985 г. возникли предпосылки реорганизации ОРОВ в академический институт — Институт биохимии, первым директором которого был его создатель Ю.М. Островский. При его непосредственном участии продолжились традиции проведения Гродненских биохимических симпозиумов. В 1972 г. прошел 2-й симпозиум по тиамину, в 1975 г. — по межвитаминным взаимоотношениям, в 1977 г. — по пантотеновой кислоте, в 1978 г. — по пентозо-фосфатному циклу.



С академиком АН СССР С.Е. Севериным

В середине 70-х гг. в сфере научных интересов Юрия Михайловича появилось еще одно направление — биохимические аспекты алкоголизма. При этом был использован оригинальный методический подход — выяснение метаболических различий у крыс с различной алкогольной мотивацией в условиях свободного выбора. Были изучены особенности обмена свободных

аминокислот, липидов, глюкозы, ацетальдегида в тканях крыс, предпочтительно потребляющих воду или этанол. На основе этих результатов была сформулирована метаболическая концепция генеза алкоголизма, представленная на Всесоюзном симпозиуме «Биохимия алкоголизма» (1980 г.). Алкогольное направление под руководством Юрия Михайловича также было достаточно продуктивным, что выразилось в защите более 10 кандидатских и нескольких докторских диссертаций. Эти результаты представлены в ряде монографий — «Этанол и обмен веществ» (1982 г.), «Биологический компонент в генезе алкоголизма» (1986 г.), «Метаболические предпосылки и последствия потребления этанола» (1988 г.).

Благодаря Юрию Михайловичу г. Гродно стал важнейшим центром биохимической науки не только в Белоруссии, но и в Советском Союзе. Участниками регулярно проводимых Гродненских симпозиумов были ведущие зарубежные и отечественные биохимики — С.Е. Северин, В.С. Шапот, Б.И. Збарский, Е.А. Строев, В.Б. Спиричев, А.Г. Халмурадов, А.Я. Розанов, И. Ульбрих, В.К. Кухта, А.А. Чиркин.

Ю.М. Островский — основатель Гродненской биохимической школы, в которую входят два десятка докторов наук и около 80 кандидатов наук [3]. Благодаря ему г. Гродно стал академическим городом, важным научным центром с международной известностью. К сожалению, Юрий Михайлович рано ушел из жизни — в возрасте 66 лет, но даже спустя 30 лет отчетливо видна его масштабность и значимость. Остаются актуальными его научные идеи и достижения, функционирует созданный им институт, успешно развивается Гродненская биохимическая школа, сохраняется добрая память в сердцах его учеников и коллег.

Список литературы

1. Лелевич, В.В. Кафедре биохимии ГрГМУ 60 лет — прошлое и настоящее / В.В. Лелевич // Журнал ГрГМУ. — 2019. — №2. — С. 234–239.
2. Лелевич, В.В. История создания и развития кафедры биохимии ГрГМУ / В.В. Лелевич // Актуальные проблемы биохимии : материалы науч.-практ. конф. — Гродно: ГрГМУ, 2019. — С. 14–17.
3. Мойсеёнок, А.Г. У истоков Гродненской научной биохимической школы / А. Г. Мойсеёнок // Журнал ГрГМУ. — 2019. — № 3. — С. 340–347.

YU.M. OSTROVSKY AS A BRILLIANT SCIENTIST, A WISE TEACHER AND TALENTED ORGANIZER

Lelevich V.V.

*Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The article presents a data on the professional activities of Academician Yu.M. Ostrovsky. His role in the formation of the Department of Biochemistry of the Grodno Medical Institute, the Department of Metabolic Regulation and the Institute of Biochemistry of the Academy of Sciences of Belarus is reflected. The main trends and achievements developed under the leadership of Yu.M. Ostrovsky are highlighted.*

БЕЛОРУССКИЙ БИОХИМИК И ПУБЛИЦИСТ АКАДЕМИК Ю.М. ОСТРОВСКИЙ

Чиркин А.А.

*Учреждение образования «Витебский государственный университет
имени П.М. Машерова»,
г. Витебск, Республика Беларусь*

Резюме. В статье описан жизненный путь академика Ю.М.Островского. Даны основные этапы развития Гродненской биохимической школы и Отдела регуляции обмена веществ АН БССР (с 1985 г. — Института биохимии). Рассмотрены оригинальные высказывания Ю.М. Островского по разрабатываемым им научным направлениям и некоторым вопросам развития белорусской нации. Показано, что творческое научное наследие академика Ю.М. Островского реализуется в работах его учеников. Научные концепции и идеи академика Ю.М. Островского использованы при написании 500 научных работ и при выполнении более 150 диссертационных работ, в том числе 87 под его руководством и при научном консультировании.



Юрий Михайлович Островский (Юрый Міхайлавіч Астроўскі) родился 29 июня 1925 г. Детство и юность прошли в г. Минске. Школу окончил в 1941 г. и до 1944 г. вместе с семьей находился в г. Слониме. После освобождения Слонима был призван в Красную армию. После демобилизации учился в Военно-медицинской академии в г. Ленинграде и затем — в Минском медицинском институте, который окончил в 1950 г. Свою трудовую деятельность начал в качестве заведующего отделом и лабораторией Полоцкой санитарно-эпидемиологической станции. Здесь он впервые оценил практическое значение биохимических исследований для медицины. В 1956 г. стал ассистентом кафедры биохимии Витебского медицинского института. В это время кафедрой биохимии руководил неординарный ученый, профессор В.С. Шапот, который разрабатывал биохимические аспекты опухолевого роста и биохимические основы деятельности мозга. Этот период жизни был определяющим в выборе основного дела, а именно — служению великой науке биохимии. С 1959 г. жизнь Ю.М. Островского связана с г. Гродно. Здесь он заведовал кафедрой биохимии Гродненского медицинского института. В 1965 г. успешно защитил докторскую диссертацию, а в следующем году ему было присвоено ученое звание профессора. Из талантливых молодых выпускников и приглашенных исследователей в 1975 г. Ю.М. Островский создал вначале Отдел регуляции обмена веществ Академии Наук БССР, а затем в 1985 г. — Институт биохимии Академии наук БССР. В 1977 г. Ю.М. Островский был избран членом-корреспондентом, а в 1986 г. — академиком АН БССР. За заслуги в области развития биохимии в Беларуси в 1978 г. ему было присвоено почетное звание — Заслуженный деятель науки БССР. Умер Ю.М. Островский 31 декабря 1991 г. в возрасте 66 лет. Спустя 4 года, посмертно Ю. М. Островскому была присуждена Премия НАН Беларуси за фундаментальные и прикладные исследования по метаболизму тиамина [1, 3, 5].

Итак, жизненный цикл Ю.М. Островского замкнулся: Минск — Слоним — Полоцк — Витебск — Гродно — Минск. Этот человек всю свою жизнь прожил в старинных городах Беларуси, он любил свою землю, свой народ и белорусский язык.

Целью статьи является оценка личности белорусского ученого и общественного деятеля Ю.М. Островского и его опыта в развитии отечественной науки.

Материалы и методы исследования. В работе использованы основные публикации Ю.М. Островского (около 500 работ, в том числе 9 монографий, 15 изобретений), сведения о видном белорусском ученом-биохимике из исторических и научных словарей, свободной энциклопедии Википедии, опыт 26-летнего общения А.А. Чиркина со своим научным руководителем и коллегой академиком Ю.М. Островским, воспоминания первого поколения гродненских биохимиков, составивших костяк Института биохимии НАН Беларуси (член-корреспондент НАН Беларуси, д. б. н. А.Г. Мойсеёнок, д. б. н. В.У. Буко, д. б. н. П.С. Пронько, д. б. н. В.В. Виноградов, д. б. н. Л.И. Надольник и др.), анализ использования научных концепций и идей академика Ю.М. Островского в планировании и выполнении более 150 диссертационных работ (в том числе 87 под его личным руководством и при научном консультировании).

Результаты исследования и их обсуждение. Знакомство с Учителем. Когда я поступил на лечебный факультет Витебского медицинского института, Ю.М. Островский уже руководил кафедрой биохимии в Гродненском медицинском институте. После окончания института я был назначен заведующим биохимической лабораторией ЦНИЛ Витебского медицинского института (ВГМИ) и продолжал студенческие исследования по возрастным особенностям обмена веществ крыс при нагрузках атерогенной диеты. Полученные результаты не укладывались в стройную систему доказательств для диссертации на соискание кандидата медицинских наук, поэтому я поехал в г. Минск к известному руководителю студенческих научных работ по различным отраслям медицинской химии доценту В.А. Бандарину. Вадим Александрович принял меня, выслушал и посоветовал обратиться за профессиональной консультацией к биохимику профессору Ю.М. Островскому. Юрий Михайлович полистал «лоскутное одеяло» моих исследований и предложил рассмотреть результаты с учетом понятия «гидрофобная площадка липопротеинов» и... все сложилось в завершённую концепцию. С этого времени до конца жизни Юрий Михайлович являлся для меня Учителем, который не давал мне тем для исследований (я их создавал сам), но всегда и везде был открыт и доступен для обсуждения различных научных и организационных вопросов. Я ежегодно бывал в г. Гродно, полюбил этот город, был счастлив общению с Учителем и моими сверстниками-биохимиками. В шестидесятые-семидесятые годы Витебский медицинский институт по разным причинам оказался местом работы многих видных ученых из Москвы и Ленинграда, он помогал квалифицированными кадрами Гродненскому и Гомельскому медицинским институтам и входил в десятку экспериментальных медицинских вузов СССР. В те годы в биохимической лаборатории ЦНИЛ ВГМИ уже были уникальные приборы: ультрацентрифуга L2-65B (Спинко, США), спектрофлуориметр MPF-2A (Хитачи, Япония), двулучевой спектрофотометр, прекрасная морфологическая и иммунологическая лаборатории и др. Их качественному использованию помогал Юрий Михайлович. В этом году в связи с 75-летием победы в Великой Отечественной войне и в честь ныне здравствующего участника войны и в последующем видного дерматолога, инициатора широкого применения ультразвука в медицине профессора Л.И. Богдановича была опубликована монография об экспериментально-клиническом обосновании метода лечения фонофорезом фторированными стероидными гормонами нейродермита. Проект этой книги был подготовлен 40 лет назад. Основное значение этой публикации заключается в том, что уже в те годы была создана возможность «решать медицин-

ские проблемы, используя комплекс морфологических, биофизических, биохимических и клинических методов, которые не утратили информативности и достоверности в наши дни молекулярно-биологических и биоинформационных исследований» [2].

Биохимические исследования научной школы Ю.М. Островского.

Профессор Ю.М.Островский был удивительно доброжелательным, терпеливым, высокообразованным и интеллигентным человеком, вдумчивым педагогом и блестящим лектором. К нему с полным правом можно отнести слова академика НАН РБ Г.И. Сидоренко, высказанные в адрес своего учителя: «...я, вспоминая В.А. Бандарина, назвал обязательные качества, которыми должен обладать лектор: три «Э» — эрудиция, эмоциональность, эстетика. Именно благодаря им можно увлечь студенческую аудиторию и завоевать ее внимание» (Медицинские новости. — 2004. — №8. — С. 101–102).

Основные научные исследования выполнялись под руководством Ю.М. Островского в области витаминологии, регуляции обмена веществ и ряда направлений клинической биохимии (наркология, онкология). Изучена природа центров и группировок на белке и в молекуле тиамина, ответственных за протеидизацию витамина, сформулированы основные положения, обосновывающие рациональное применение в медицине антивитаминов. Им создана оригинальная концепция развития алкоголизма, дающая перспективы лечения этой болезни.

Ю.М. Островский всегда занимался жизненно важными для Беларуси научными проблемами. Еще работая в г. Полоцке, он активно включился в проблему диагностики и лечения туберкулеза с биохимических позиций — выявил важную патогенетическую роль тиамина. Тиамин является важнейшим компонентом общего пути катаболизма, когда пировиноградная кислота, полученная из первичного транспортера солнечной энергии глюкозы, превращается в общий метаболит — ацетил-КоА, который в митохондриях клеток-потребителей служит источником образования основного источника энергии в них, а именно — АТФ. Развивая эти идеи с позиций экспериментальной и клинической витаминологии в г. Гродно на кафедре биохимии медицинского института, затем в Отделе регуляции обмена веществ и Институте биохимии АН БССР, Ю.М. Островский создал концепцию уникальной роли двууглеродных соединений в жизнедеятельности живых организмов. Эта концепция позволила ученому перейти к важнейшей государственной проблеме — пониманию биохимической сущности и на ее основе разработать способы молекулярной диагностики, профилактики и лечения алкоголизма. Особую роль в этом сыграли данные об эндогенных этаноле и ацетальдегиде и о врожденной способности некоторых млекопитающих изначально предпочитать воду или раствор этанола при возможности выбора. В итоговом обзоре исследований («Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя», 1988 г.) он писал, что неоднородность сравниваемых групп животных захватывает широкий круг биохимических показателей, при этом предпочитающие этанол (ПЭ) особи отличаются от своих антиподов (предпочитающих воду — ПВ) по сниженному уровню эндогенного этанола, более высокой активности ферментов катаболизма алкоголя и ацетальдегида, более интенсивному использованию ацетата в различных реакциях. Значительную роль в организации обмена веществ ПЭ крыс, по-видимому, играет характер субстратов, используемых для энергетических целей, что нашло отражение в особом замедленном типе функционирования начальных стадий распада углеводов (глюкозы), в некотором накоплении заменимых аминокислот в печени, относительной инсулиновой недостаточности.

В этом же году G. Reaven суммировал признаки патологии каждого четвертого жителя планеты Земля — метаболического синдрома, в основе которого лежит инсулинорезистентность, т. е. нарушение утилизации клетками носителя солнечной энергии молекул глюко-

зы. Здесь очевиден логический мост между алкоголизацией человечества и поражением у потребляющих алкоголь фундаментальных механизмов использования солнечной энергии, благодаря которой и возникла жизнь на Земле. Ю.М. Островский не успел переключиться на эту проблему, но жизненность ее подтверждается деятельностью его учеников: В.У. Буко награжден престижной международной премией за разработку вопросов неалкогольного стеатогепатита, А.А. Чиркин и соавторы получили патент на уникальное средство для профилактики метаболического синдрома, а на базе Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси было проведено несколько Международных симпозиумов по метаболическому синдрому.

Ю.М. Островский как организатор и руководитель научных направлений всегда старался сделать научные исследования фундаментальными, но ориентированными на решение наиболее важных для государства проблем. Так возникли кормовые добавки из отходов объединения «Гродно Азот» для питания пушных зверей, композиции, содержащие витамины, кофакторы ферментов и аминокислот, — для офтальмологии, наркологии и других разделов медицины. Его неординарное мышление позволяло получать информацию международного класса даже при недостаточном финансировании. В 1976 г. он сформулировал метаболическую концепцию генеза алкоголизма: «Общий подход в оценке особенностей обмена веществ, определяющих различное отношение (переносимость, предпочтение, алкоголизм) человека и экспериментальных животных к этанолу, может основываться на допущении, что сам этанол, его производные и другие двууглеродные соединения вступают в организме в сложные (синергизм, конкуренция, образование необходимых метаболитов и т. п.) взаимоотношения и взаимодействия, формирующие в конечном итоге состояние метаболического фона, к которому организм стремится (комфорт) или которого избегает (дискомфорт). Биохимический, молекулярный характер рассматриваемого явления, таким образом, в качестве производных частных будет включать в себя известные подходы ко всей проблеме различных исследователей, из которых каждый придает решающее значение какому-либо одному фактору или их многообразным комбинациям» [4].

Ю.М. Островский и развитие отечественной биохимии. Свою первую монографию (Тиамин. Избранные главы по биохимии витамина В₁, 1971 г.) Ю.М. Островский начал с посвящения «Соратникам по работе, белорусским биохимикам посвящается. Автор». Этот принцип видеть в каждом человеке от студента до академика, работающем по биохимической тематике, соратника был основным стержнем педагогической и научной деятельности Ю.М. Островского. За короткий срок заведования кафедрой биохимии Гродненского медицинского института он привлек к научной работе десятки студентов, которые и составили основу Отдела регуляции обмена веществ, а затем — Института биохимии АН БССР. В Беларуси всегда были крупные ученые-биохимики. Я не буду называть их имена, чтобы случайно известный ученый не попал бы в раздел «и другие». Отмечу лишь, что Ю.М. Островский занимал видное место в плеяде белорусских биохимиков, потому что он создал Институт биохимии и большую научную школу. Он заботился о престиже белорусской науки и о развитии контактов с биохимиками других республик СССР и зарубежных стран. Он явился организатором постоянных Всесоюзных Гродненских симпозиумов по различным проблемам биохимии и заложил основы белорусско-российских симпозиумов. Идеи Ю.М. Островского о важности биохимии как базовой науки, которая внесла весомый вклад в развитие молекулярной биологии, генной инженерии, протеомики, метаболомики, молекулярно-генетического анализа, находят свое отражение в учебных курсах по подготовке биохимиков, в перспективных научных исследованиях белорусских ученых. Следует отметить, что наряду с известными биохимическими центрами столицы Беларуси

г. Минска молекулярные исследования высокого уровня проводятся практически во всех областных центрах нашего государства.

Ю.М. Островский — публицист. В одной из публицистических работ Ю.М. Островский писал: «Лёс мой неаддзельны ад лёсу роднага краю» («Літаратура і мастацтва», 1992. — 15 мая. — С. 14–15). Опыт его жизни лег в основу размышлений ученого о происхождении белорусов и их роли в истории центральных земель Европы [6].

Завершая статью о замечательном белорусском ученом и педагоге хочется вспомнить строчки поэта Ю.М. Островского «Душу раскрыўшы насцеж, ішоў у гэты свет...» — как сказал, так и прожил свою жизнь. Он любил свою землю, свой народ и все делал для того, чтобы у белорусов и людей других национальностей, проживающих на прекрасной земле в центре Европы, было сильное, справедливое и спокойное государство.

Он писал:

Спадчына —

Гэта не толькі рэчы,

Гэта не толькі рэкі,

Гэта не толькі мова,

Гэта не толькі песні...

Спадчына —

Тое, што запрацаваў,

Тое, што не атрымаў.

Чтобы получить целиком это наследие, Ю.М. Островский определил гражданскую цель своей жизни как участника строительства государства, сущностью которого будут «Незалежнасць, нейтралітэт, свабода, мірнае будаўніцтва і дабрабыт народа». А молодежи он советовал: «Стаўся да свайго народа, як да ўласнай сям’і. І ты заўсёды зразумееш, як трэба паводзіць сябе ў кожным канкрэтным выпадку. Навучыся паважаць іншыя народы, але не губляй пры гэтым уласнага гонару і годнасці. У кожным выпадку пры вырашэнні пытання аб спрыянні, у любой справе аддавай перавагу суайчыннікам. Бо яны таксама, як і ты, клапацяцца аб дабрабыце ўласнай краіны, а гэта значыць, кожнага з нас паасобку».

Список литературы

1. Воробьев, В.В. Академик Ю.М. Островский — ученый, педагог и организатор биологической науки на Гродненщине / В.В. Воробьев, Н.К. Лукашик // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — Гродно: ГГМУ, 2008. — № 3. — С. 52–53.
2. Лишай Видаля: экспериментальное и клиническое применение ультрафонофореза флюоцинолона ацетонида / В.М. Козин [и др.]. — Витебск: ВГМУ, 2020. — 106 с.
3. Меженный, А.М. Академик Ю.М. Островский — жизнь для родины и науки / А.М. Меженный, В.К. Протасевич // Материалы юбилейной конференции врачей Могилевщины: (к 145-летию областного Врачебного общества): в 2 ч.; редколлегия: В.А. Малашко (ответственный редактор) [и др.] — Ч. 1, 2007. — 278 с. — С. 223–227.
4. Островский, Ю.М. Метаболическая концепция генеза алкоголизма / Ю.М. Островский // Биохимия алкоголизма. — Минск : Наука и техника, 1980. — С. 106–107.
5. Развитие научных идей академика Ю.М. Островского в гродненской биохимической школе (К 80-летию со дня рождения) / А.Г. Мойсеенок [и др.] // Известия НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2006. — № 2. — С. 119–123.
6. Чиркин, А.А. Белорусский биохимик академик Ю.М. Островский / А.А. Чиркин // Веснік ВДУ. — 2013, № 5. — С. 43–49.

**ACADEMICIAN YU.M. OSTROVSKY, BELARUSIAN BIOCHEMIST
AND PUBLICIST (ON THE 50TH ANNIVERSARY OF THE INSTITUTE
OF BIOCHEMISTRY OF THE NAS OF BELARUS)**

Chirkin A.A.

*Educational Establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»,
Vitebsk, Republic of Belarus*

Summary. *The article describes the career of Academician Yu.M. Ostrovsky and the main stages in development of the Biochemical School in Grodno and the Division of Metabolic Regulation of the BSSR Academy of Sciences (since 1985 the Institute of Biochemistry). The basic publications of Yu M. Ostrovsky and his students on the biochemistry of thiamine and biological foundations of alcoholism were described. The original statements of Yu.M. Ostrovsky on the research areas developed by him and some issues of the Belarusian nation were considered. It is shown that the creative scientific heritage of Yu.M. Ostrovsky has been implemented by his students. The scientific concepts and ideas of Yu.M. Ostrovsky were used in 500 scientific papers and the implementation of more than 150 scientific degree dissertations, including 87 works written under his supervision and with scientific advice.*

ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТА
UVA ДИАПАЗОНА И ВИДИМОГО СВЕТА В ПРИСУТСТВИИ
РИБОФЛАВИНА

Агейко С.А.¹, Степура И.И.¹, Степура В.И.², Травкина М.³, Янцевич А.В.³

¹Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь;

²Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»,
г. Гродно, Республика Беларусь;

³Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь

Резюме. В отсутствие в растворе фотосенсибилизаторов тиамин и его фосфорные эфиры устойчивы к воздействию видимого света. Облучение видимым светом, а также ультрафиолетом UVA (диапазон длин волн 315–400 нм) тиамин не приводило к изменению его содержания в растворе и образованию продуктов фотолиза. Тиамин и его фосфорные эфиры существуют в растворах при нейтральном значении pH среды в виде различных спектрально-различимых ионных и таутомерных форм. Примерно 97 % составляет монокатионная форма тиамин с закрытым тиазоловым циклом, а содержание минорных форм таких, как тиольная, трициклическая форма и дикаатионная в равновесных условиях не превышает 2–3 % от общего количества тиамин в растворе.

Под действием ультрафиолета UVA и видимого света ($\lambda > 400$ нм) на водные растворы тиамин в смеси с рибофлавином происходит окисление трициклической формы тиамин в тиохром ($m/z = 262,0882$) и оксодигидротиохром ($m/z = 278,0839$). Оксодигидротиохром не является конечным продуктом окисления и под действием синглетного кислорода образует 2,3-оксо-тиамин ($m/z = 295,0856$). Под действием синглетного кислорода тиольная форма тиамин окисляется с образованием дисульфида тиамин ($m/z = 562,2144$).

Под действием синглетного кислорода на монокатионную форму тиамин происходит образование окисленного продукта тиамин, который содержит карбонильную группу на втором углероде тиазолового компонента (тиазолон тиамин $m/z = 280,09926$) и является структурным аналогом промежуточного переходного состояния нормального кофермента тиамин-зависимых ферментов. Это структурное соответствие позволяет фосфорилированным карбонильным производным тиамин связываться с высоким сродством в 1000–10000 раз превышающих равновесные константы связывания собственно молекул тиаминдифосфата и эффективно ингибировать активность тиамин-зависимых ферментов и вызывать повреждение и гибель клеточных структур глаза. В то время как негативный эффект снижения уровня тиамин в тканях может корректироваться приемом повышенных доз тиамин, влияние ингибиторов скорректировать значительно труднее. Поэтому весьма важным является поддержание высокого уровня тиамин в крови для профилактики развития катаракты и других повреждений клеточных структур глаза при воздействии интенсивного видимого света и ультрафиолета UVA диапазона.

Введение. Ионизирующее и ультрафиолетовое излучение вызывает повреждение и гибель клеток вследствие как прямого воздействия на структуру ДНК и белков, так и вследствие генерации активных форм кислорода и активных карбонильных соединений, оказывающих повреждающее действие. Белки составляют до 70 % от сухого веса клеток и тканей, поэтому во многих случаях служат важной мишенью воздействия ультрафиолета или ионизирующего излучения. Индольное кольцо триптофана, а также тирозильные остатки обладают наиболее высоким поглощением в ближнем УФ диапазоне среди хромофорных групп (исключая простетические), входящих в состав белков.

Прямое воздействие ультрафиолета осуществляется путем поглощения излучения белками или связанными с ними хромофорными группами с образованием возбужденных состояний (синглетных или триплетных) либо свободных радикалов вследствие фотоионизации [10].

Другие важнейшие процессы, приводящие к окислению белков, связаны с генерацией синглетного кислорода благодаря переносу энергии с возбужденных ароматических аминокислотных остатков белка, в первую очередь остатки тирозина и триптофана, на молекулы кислорода в основном, триплетном состоянии [2, 6]. В результате этой реакции образуется синглетный кислород ($^1\text{O}_2$).

Тиамин (или витамин B_1) является важнейшим незаменимым фактором питания и используется в организме в качестве структурного компонента молекулы тиаминдифосфата (ТДФ). ТДФ является кофактором таких важнейших ферментов энергетического метаболизма, как пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа. ТДФ также является кофактором транскетолазы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла. Тиамин не является классическим витамином антиоксидантом. Однако дефицит тиамина и окислительный стресс вызывают нейродегенеративные заболевания [7], гибель нейронов [8], развитие дегенеративных процессов в фибриллах клеток хрусталика [22].

При воздействии ультрафиолета на водные растворы тирозина, триптофана или водные растворы белков генерируются синглетный кислород, а также феноксильные и триптофанильные свободные радикалы аминокислот или свободные радикалы соответствующих аминокислотных остатков белков, которые окисляют тиамин и фосфорные эфиры тиамина [1].

Тиамин не поглощает электромагнитное излучение с длинами волн больше 300 нм и устойчив к действию ультрафиолета области UVA и видимого света. Однако в организме присутствует целый ряд хромофоров и простетических групп ферментов белков, способных генерировать синглетный кислород под действием видимого света. Это рибофлавин, витамин B_6 , белки, содержащие ковалентно связанные фосфопиридоксильные остатки с первичными аминогруппами (α -аминогруппами остатков лизина, α -аминогруппами N-конца полипептидной цепи белковой макромолекулы) [18].

Как известно, рибофлавин (витамин B_2) при облучении видимым светом образует активные формы кислорода [3, 11, 12]. Рибофлавин выступает в роли фотосенсибилизатора, взаимодействует с кислородом и переводит молекулу кислорода в электронно-возбужденное синглетное состояние. Синглетный кислород генерируется благодаря переносу энергии с возбужденных триплетных состояний молекул рибофлавина на молекулы кислорода в основном триплетном состоянии. Синглетный кислород окисляет многие субстраты, в том числе фенолы, ароматические аминокислоты, пептиды, инактивирует многие ферменты [3, 6, 11]. Под действием синглетного кислорода поражаются такие организмы, как вирусы, бактерии, грибы, многоклеточные растения и животные [3, 6, 12].

Сенсибилизированные рибофлавином фотохимические реакции, вероятно, протекают также *in vivo*. Рибофлавин поглощает видимый свет, проходящий сквозь кожу и генерирует активные формы кислорода, свободные радикалы рибофлавина, которые инактивируют бактерии и вирусы в крови.

Вероятно, рибофлавин может играть роль эндогенного инактиватора различных патогенов, в том числе вирусов и бактерий [15].

Ранее было показано, что тиамин эффективно окисляется синглетным кислородом, который генерируется рибофлавином под действием видимого света [16].

Целью данной работы было исследование фотосенсибилизированного рибофлавином окисления тиаминa под действием синглетного кислорода, образующегося при воздействии ультрафиолета или видимого света на водные растворы тиаминa в смеси с рибофлавином, проведение идентификации и установление строения продуктов окисления витамина.

Материалы и методы исследования. Масс-спектры тиаминa и его производных зарегистрированы с использованием квадрупольно-времяпролетного тандемного масс-спектрометрического детектора Q-TOF 6550 в режиме ионизации электрораспылением (ESI). Измерения концентрации тиохрома и оксидигидротиохрома проводили также на спектрофлуориметре CM2203 (Солар, Беларусь). Флуоресцентные свойства производных тиаминa изучали методами стационарной и разрешенной во времени флуоресценции [17, 19], растворы тиаминa облучали ультрафиолетом (UVA. Область 315–400 нм) и видимым светом $\lambda > 450$ нм.

Растворы тиаминa, а также растворы тиаминa в смеси с рибофлавином облучали ртутной лампой СВД-120А. Для выделения областей спектра излучения в ультрафиолетовом (UVA, область 315–400 нм) и видимом ($\lambda \geq 400$ нм) диапазонах использовали светофильтры, также облучение могло проводиться в стеклянной кювете.

Для выделения линий ртути 365 нм и 436 нм применяли светофильтры УФС-6 и СЗС-22 соответственно, а для выделения спектральной области 320–500 нм светофильтр СС2. Облучение светом с $\lambda > 300$ нм производилось в стеклянной кювете, в остальных случаях — в кварцевой. Растворы тиаминa в смеси с рибофлавином в процессе эксперимента хранили в светонепроницаемой коробке для исключения облучения образцов рассеянным солнечным светом. Измерения спектров поглощения проводили на спектрофотометре Cary-100 (США).

Результаты исследования и их обсуждение. Окисление тиаминa под действием видимого света в реакциях сенсибилизированных рибофлавином. Тиамин, а также продукты ионизации и фрагменты молекулы, возникшие в процессе ESI ионизации, выходят в виде фракции с $R_T = 0,973$ мин. Обращает внимание тот факт, что в масс-спектре кроме молекулярного иона тиаминa ($m/z = 265,1117$) присутствуют два наиболее интенсивные пики, а именно, пик с $m/z = 122,07$ и пик с $m/z = 144,07$, принадлежащие соответственно фрагменту аминопиримидинового (AP) и тиазолового (Tz) компонента, образовавшихся после расщепления связи C-N метиленового мостика. Эти два пика являются наиболее высокоинтенсивными и имеют наибольшую молекулярную массу среди фрагментов молекулы тиаминa. Все остальные пики, присутствующие в масс-спектре тиаминa, в данной фракции имеют более низкие значения молекулярной массы и являются фрагментами этих двух ионов с $m/z = 122,07$ (AP) и $m/z = 144,07$ (Tz) (табл. к рис. 1). Структурные формулы соединений приведены в табл. 3.

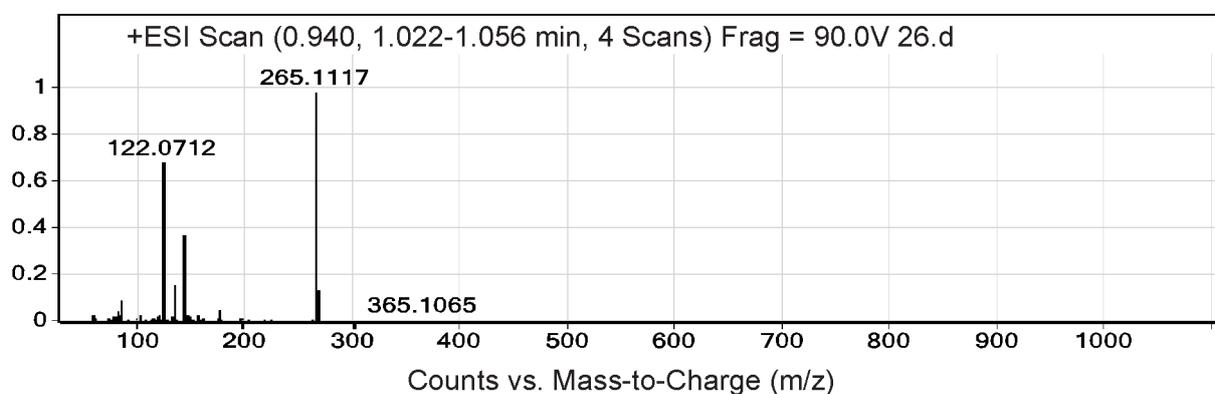


Рисунок 1 — Масс-спектр тиаминa (I). Молекулярный ион тиаминa $m/z = 265,1117$, аминопиримидиновый с $m/z = 122,07$ и тиазоловый с $m/z = 144,07$ фрагменты

Таблица 1 — Значения m/z и интенсивности пиков продуктов фотосенсибилизированного рибофлавином окисления тиамин (Т) под действием ультрафиолета и видимого света (область λ больше 300 нм, облучение в стеклянной кювете)

Состав раствора и время воздействия UVA	T $m/z =$ 265,1112 [M] ⁺ 266,1145 [M+H] ⁺	AP $m/z =$ = 122,0711	Tz $m/z =$ = 144,0478	2,4-оксо- тиазол-Т	TChr $m/z =$ = 262,0882 [M] ⁺ 263,0960 [M+H] ⁺	ODTChr $m/z =$ = 278,0839 [M] ⁺ 279,0909 [M+H] ⁺	TSST $m/z =$ = 563,2197 [TSST ₀ +H] ⁺ 8796 564,226 [TSST ₁ +H] ⁺ 2672	RF $m/z =$ = 377,14
T (0,05 мМ) в H ₂ O	94132	68000	37358	—	—	—	—	—
T (0,05 мМ)+ 20 мин UVA и видимый свет	93052	65000	35300	—	—	—	—	—
T (0,05 мМ) + RF 30 мин UVA(*)173№	81800	51700	25560	1550	540	4500	6890	168 000
T (0,05 мМ) + + N3+ RF 30 мин UVA(*)176	71812	40671	21300	—	—	580	—	189 629

При отсутствии в растворе фотосенсибилизатора тиамин и его фосфорные эфиры устойчивы к воздействию видимого света. Облучение видимым светом, а также ультрафиолетом UVA (диапазон длин волн 315–400 нм) в течение 0,5–1 ч водных растворов тиамин не приводило к изменению его содержания в растворе и образованию продуктов фотолиза. В масс-спектре водного раствора тиамин после облучения в течение 30 мин, 1 ч регистрируются только молекулярные ионы тиамин с $m/z = 265,1112$, и ионы аминопиримидинового и тиазолового компонентов с $m/z = 122,0712$ и как это представлено на рис. 1 и в табл. 1.

При облучении видимым светом водных растворов тиамин в присутствии рибофлавина наблюдали окисление тиамин. Фракции продуктов окисления тиамин с временами удерживания R_t равными 2,178–2,504 мин содержат кроме молекулярных ионов тиамин с $m/z = 265,1112$, дисульфида тиамин с $m/z = 563,2215$ ионы продукта с $m/z = 297,2215$. Этот продукт фотолиза был с $m/z = 297,2215$ идентифицирован как молекулярный ион 2,4-оксо-тиазол-тиамин. Структурная формула приведена в табл. 3.

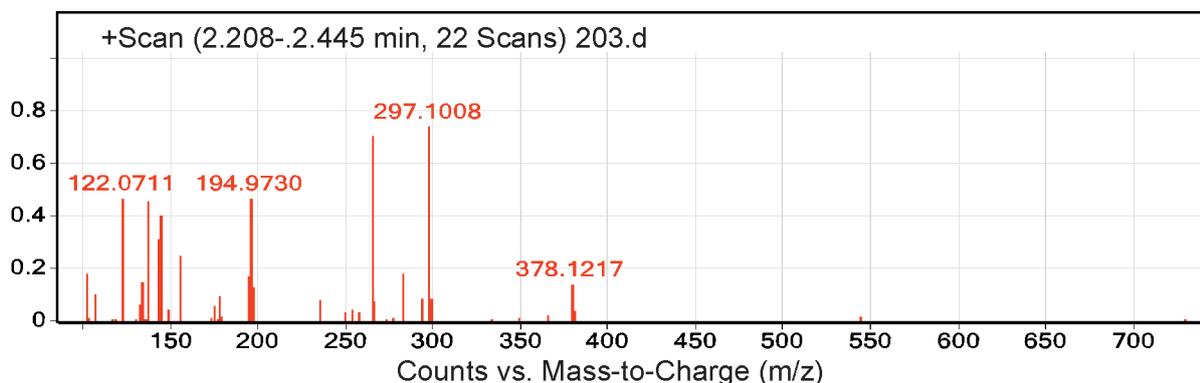


Рисунок 2 — Масс-спектры продуктов, полученных после фотолиза тиамин в присутствии рибофлавина под действием ультрафиолета UVA-диапазона и видимого света

Фракция, содержащая молекулярные ионы тиамин, дисульфида тиамин и 2,4-оксо-тиазол-тиамин дисульфида с $m/z = 265,1120$, $m/z = 563,2215$, $m/z = 297,1012$ соответственно была

получена после разделения облученного раствора тиамин в смеси с рибофлавином на колонке Аджилент и последующей ионизации методом ESI.

Фракция со временем удерживания 2,516 мин содержала пики тиохрома и оксодигидротиохрома и небольшие количества дисульфида тиамин с $m/z = 263,0960$, $m/z = 279,0909$, $m/z = 563,2215$ соответственно. Причем, как видно из хроматограммы, представленной на рис. 3, содержание оксодигидротиохрома превышало содержание тиохрома. Это позволяет предположить, что тиохром не является конечным продуктом окисления.

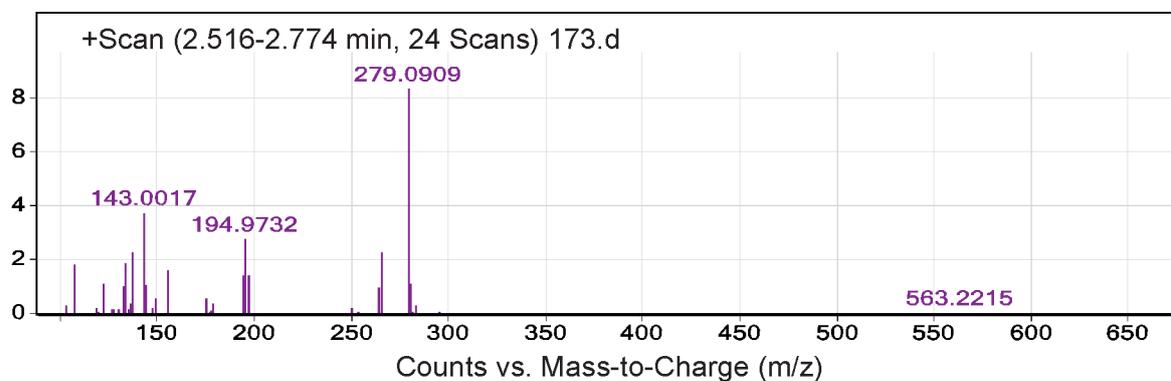


Рисунок 3 — Масс-спектры продуктов, полученных после фотоллиза тиамин в присутствии рибофлавин под действием ультрафиолета UVA-диапазона и видимого света

Значение R_t фракций продуктов фотоллиза тиамин изменялись от 2,516 до 2,774 мин. Фракция, содержащая молекулярные ионы тиохрома, оксодигидротиохрома была получена после разделения облученного раствора тиамин в смеси с рибофлавином на колонке Аджилент (и последующей ионизации методом ESI). Пик с $m/z = 263,096$ принадлежит молекулярному иону тиохрома $[M_0+H]^+$, пик $m/z = 279,009$ принадлежит молекулярному иону оксодигидротиохрома $[M_0+H]^+$, где M_0 —моноизотопная масса молекулы. Начальные концентрации тиамин и рибофлавин в растворе равны 0,02 мМ. Раствор облучали 15 мин лампой СВД-120А со светофильтром УФС-6.

Окисление тиамин в тиохром протекает главным образом с участием синглетного кислорода. Предполагаемый механизм реакции окисления трициклической формы тиамин (ТФТ) в тиохром под действием синглетного кислорода (уравнение) представлен схематично на рис. 4.



Как известно, синглетный кислород легко тушится азидом. Константа скорости тушения синглетного кислорода азидом натрия по данным литературы равен $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Азид натрия широко известен как эффективный тушитель синглетного кислорода, полученного различными методами, как химическими, так и физическими. Поэтому можно полагать, что после добавления азид натрия в раствор содержащий RF и тиамин после воздействия видимого света тиохром не будет образовываться если образование тиохрома происходит под действием синглетного кислорода. Действительно после добавления азид резко снижается выход тиохрома после воздействия ультрафиолета на водные растворы содержащие тиамин и рибофлавин.

В то же время полного ингибирования образования тиохрома не происходит под действием концентраций азид 1 мМ (рис. 5).

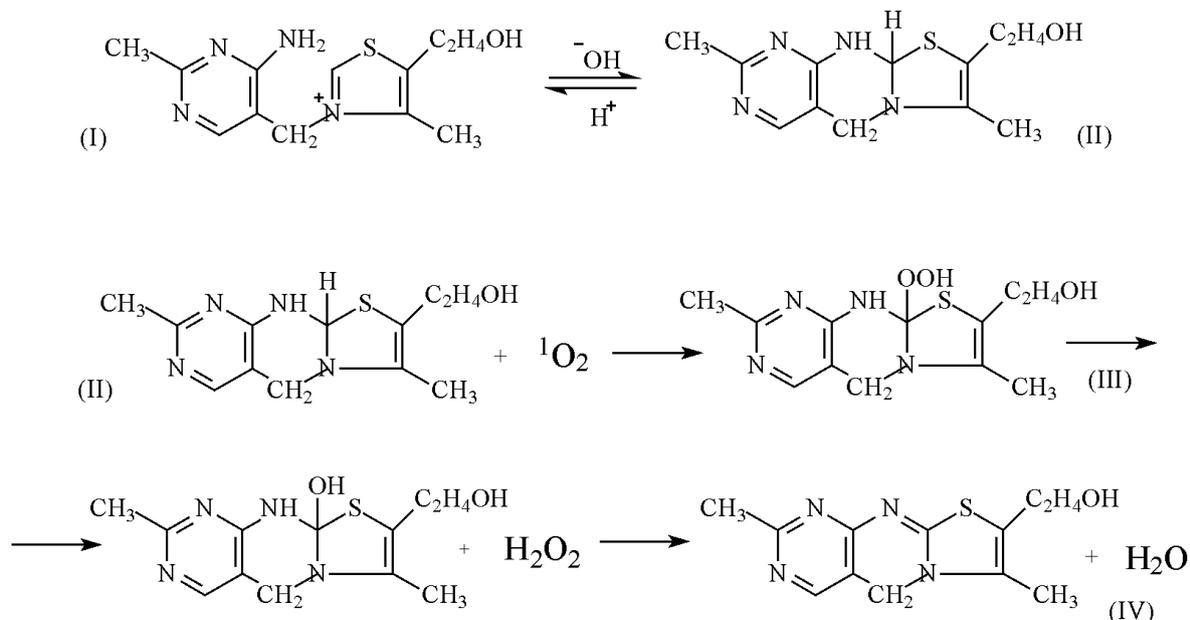
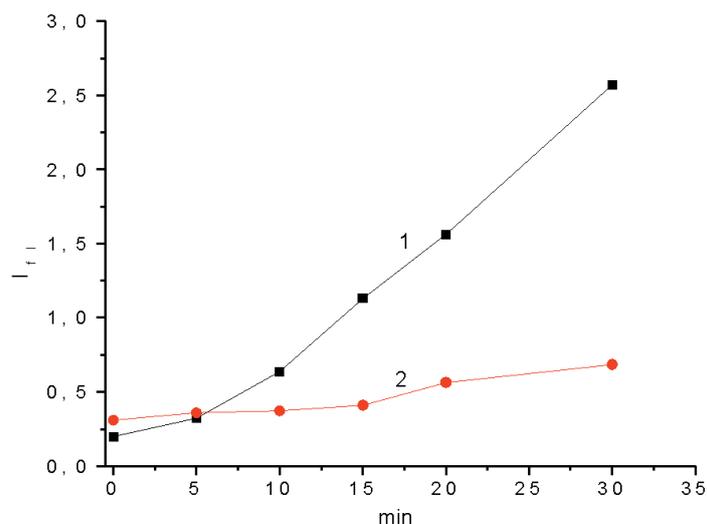


Рисунок 4 — Предполагаемая схема окисления тиамин
под действием синглетного кислорода: (I) — нейтральная форма тиамин с закрытым
 тиазоловым циклом; (II) — трициклическая форма тиамин; (III) — пероксидная форма
 трициклической формы тиамин; (IV) — тиохром



**Рисунок 5 — Образование тиохрома, регистрируемого флуоресцентным методом
 в зависимости от времени облучения водных растворов тиамин в смеси с рибофлави-
 ном (1), тиамин в смеси с рибофлавином, азидом (2) в атмосфере воздуха**

Начальная концентрация тиамин, рибофлавин 0,1 мМ, азид — 1,0 мМ.

Облучение растворов лампой СВД-120А проводили в стеклянной кювете. Длина волны возбуждения
 флуоресценции тиохрома — 360 нм, регистрации флуоресценции — 450 нм

Более высокие концентрации азид еще больше снижают выход тиохрома, поэтому можно
 полагать, что фотосенсибилизированное рибофлавином окисление тиамин в тиохром проис-
 ходит под действием синглетного кислорода. Вероятно, участие триплетных состояний RF
 в окислении тиамин в тиохром крайне мало.

**Фотосенсибилизированное рибофлавином окисление тиохрома в водных растворах
 при воздействии ультрафиолета UVA и видимого излучения в аэробных и анаэробных**

условиях. Спектр поглощения водного необлученного раствора тиохрома содержит длинноволновый максимум при 365 нм. После облучения водных растворов тиохрома в смеси с рибофлавином видимым излучением максимум поглощения тиохрома сдвигается в коротковолновую область, к 340 нм. Облучение водных растворов тиохрома в присутствии рибофлавина вызывает окисление тиохрома в оксодигидротиохром, что сопровождается снижением интенсивности флуоресценции тиохрома. Азид ингибирует окисление тиохрома в оксодигидротиохром в фотореакциях сенсibilизированных рибофлавином. Однако добавление азидата натрия лишь частично замедляет окисление тиохрома в оксодигидротиохром. Поэтому можно предположить, что вклад синглетного кислорода в окисление тиохрома относительно мал (рис. 6). Ранее показано, что рибофлавин окисляет тиохром с образованием оксодигидротиохрома и в анаэробных условиях, что свидетельствует об участии триплетных состояний в окислении тиохрома в оксодигидротиохром.

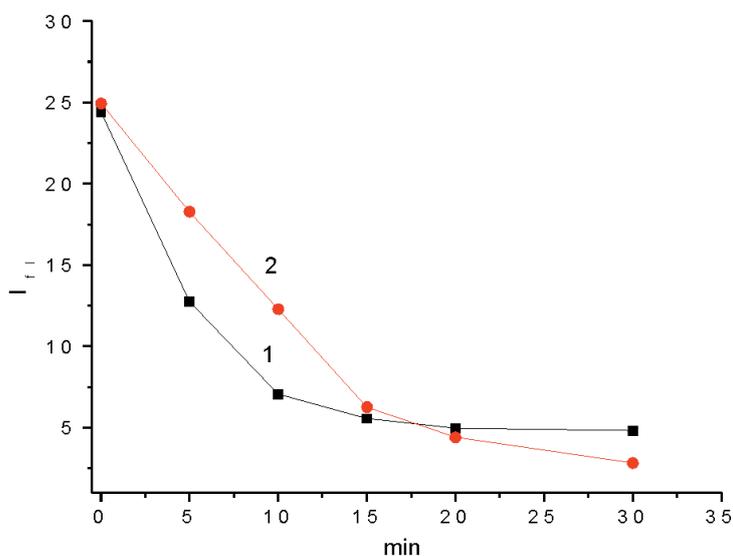


Рисунок 6 — Убыль флуоресценции тиохрома в зависимости от времени облучения его водных растворов в смеси с рибофлавином (1), ингибирование азидом окисления тиохрома в оксодигидротиохром фотосенсибилизированного рибофлавином в аэробных условиях (2)

Начальная концентрация рибофлавина и тиохрома в растворе равна 50 мкМ.

Концентрация азидата натрия 1,0 мМ. Водные растворы в атмосфере воздуха облучали ультрафиолетом UVA и видимым светом (область больше 300 нм, стеклянный светофильтр СЗС22). Возбуждение флуоресценции проводили длиной волны $\lambda_{\text{в}} = 360$ нм, интенсивность флуоресценции измеряли при $\lambda_{\text{фл}} = 450$ нм

Данные масс-спектрологии (см. табл. 2) также свидетельствуют об образовании оксодигидротиохрома после облучения водных растворов тиохрома в смеси с рибофлавином UVA и видимым светом. В присутствии рибофлавина наблюдали быстрое окисление тиохрома в оксодигидротиохром. На рис. 7 представлена фракция, которая содержит масс-спектр оксодигидротиохрома, который образовался после облучения водных растворов тиохрома в смеси с рибофлавином. Как видно из результатов, представленных на рис. 7, практически весь тиохром окислился в оксодигидротиохром после облучения.

Только для начальных промежутков времени воздействия ультрафиолета UVA наблюдали приблизительное равенство в убыли концентрации тиохрома и соответственно такое же возрастание концентрации образовавшегося оксодигидротиохрома (табл. 2).

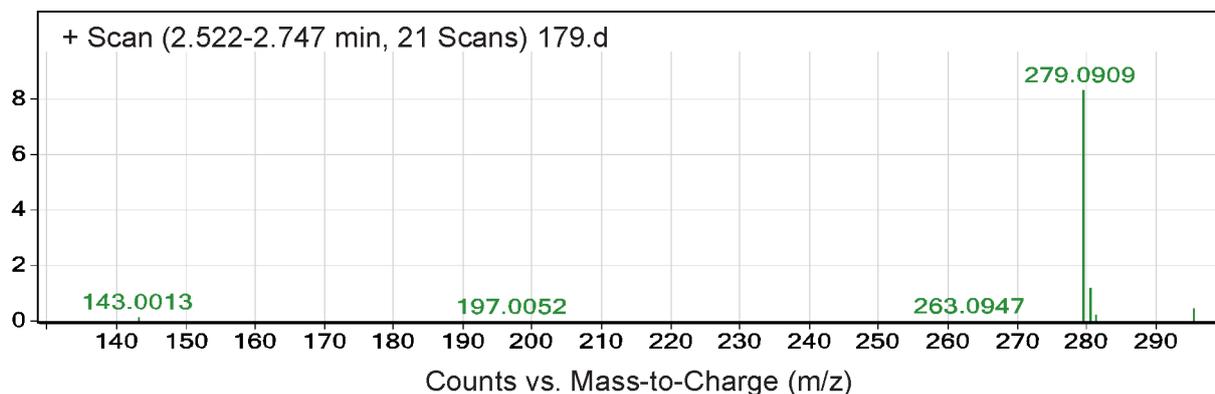


Рисунок 7 — Масс-спектр продуктов окисления тиохрома, образовавшихся после облучения водных растворов тиохрома в смеси с рибофлавином

Пик с $m/z = 263,096$ принадлежит молекулярному иону тиохрома $[M_0+H]^+$, пик $m/z = 279,091$ принадлежит молекулярному иону оксидигидротиохрома $[M_0+H]^+$, где M_0 — моноизотопная масса молекулы. Начальные концентрации тиохрома и рибофлавина в растворе равны 50 мкМ. Раствор облучали 15 мин лампой СВД-120А со стеклянным светофильтром

Таблица 2 — Значения m/z и интенсивности пиков продуктов фотосенсибилизированного рибофлавином окисления тиохрома (TChr) под действием ультрафиолета и видимого света (область λ больше 300 нм, облучение в стеклянной кювете)

Состав раствора и время воздействия UVA	TChr $m/z = 262,0882$ $[M]^+$ $263,0960$ $[M+H]^+$	ODTChr $m/z = 278,0839$ $[M]^+$ $279,0909$ $[M+H]^+$	OTChr $m/z = 276,0681$ $m/z = 277,076$ $[M_0+H]^+$ $m/z = 278,083$ $[M_0+2H]^+$	2,3-охо-Т $m/z =$ $= 295,0856$	3-охо-Т $m/z =$ $= 279,1100$ $[M_0]^+$
TChr (50 мкМ), 0 мин облучения № 141	186111	2901	—	—	—
TChr (50 мкМ), 30 мин облучения № 180	140493	20498	41 484	3847	—
TChr (50 мкМ)+ RF (50мкМ), 5 мин облучения	122557	75000	—	—	—
TChr (50 мкМ) + RF (50мкМ), 0 мин (15мин условно) облучения № 177	32004	75000	—	18976	452
TChr (50 мкМ) + RF (50мкМ), 30 мин облучения №179	328	89 985	—	79114	44277
TChr (50 мкМ) + RF (50мкМ)+ N ₃ (1мМ), 15 мин облучения № 182	—	118720	—	29755	6496
TChr (50 мкМ) + RF (50мкМ)+ N ₃ (1мМ), 30 мин облучения № 183	—	53200	—	62743	28645

Дальнейшее облучение растворов сопровождалось снижением выхода оксидигидротиохрома. Это свидетельствует, что оксидигидротиохром не конечный продукт фотолиза тиохрома, а испытывает дальнейшее превращение (табл. 2). Среди продуктов фотолиза тиохрома

обнаружены молекулярные ионы 3-оксотиамина с $m/z = 279,1089$ (VI) и молекулярные ионы 2,3-оксотиамина с $m/z = 295,0860$ (V).

На рис. 8 представлены фракции продуктов фотолиза тиамина ($R_t = 3,75\text{--}4,166$ мин), которая содержит молекулярные ионы с $m/z = 279,1089$ (VI) и молекулярные ионы 2,3-оксотиамина с $m/z = 295,0860$ (V). Структурные формулы продуктов фотолиза приведены в табл. 3.

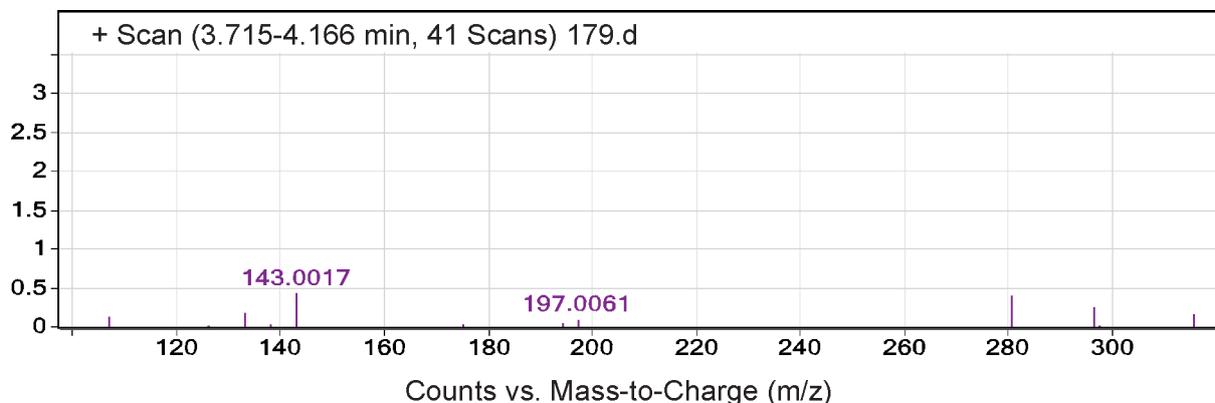
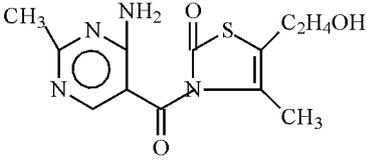
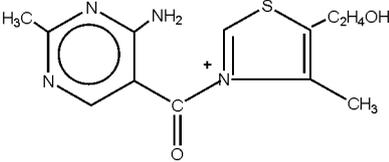
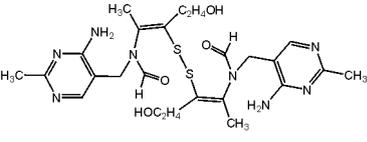
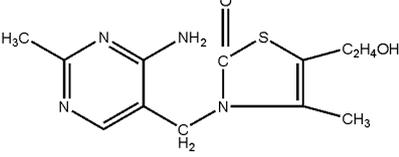
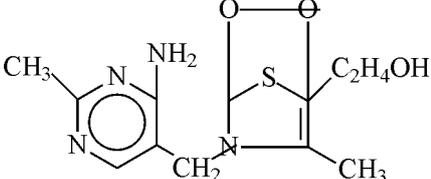


Рисунок 8 — Масс-спектр продуктов окисления тиохрома, образовавшихся после облучения водных растворов тиохрома в смеси с рибофлавином

Пик с $m/z = 279,1089$ принадлежит молекулярному иону 3-оксо-Т (VI), пик с $m/z = 295,0860$ принадлежит молекулярному иону 2,3-оксотиамину-Т (V). Начальные концентрации тиохрома и рибофлавина в растворе равны 50 мкМ. Раствор облучали 30 мин лампой СВД-120А со стеклянным светофильтром, который пропускал электромагнитное излучение с длиной волны больше 290 нм

Таблица 3 — Структурные формулы тиамина, продуктов окислительной трансформации тиамина и величины m/z их молекулярных ионов

Соединение, масса изотопологов (частота встречаемости)	Структурная формула	m/z молекулярных ионов, относительная интенсивность
Тиамин (Т) Массы изотопологов: $M_0 = 265,1123$ (81,8 %) $M_1 = 266,1149$ (12,7 %) $M_2 = 267,1102$ (4,7 %)	 (I)	$265,1115 [M_0]^+$ (100 %) $266,1143 [M_1]^+$ (13 %) $267,1086 [M_2]^+$ (3 %)
(TChr) Массы: $M_0 = 262,0888$ (81,9 %) $M_1 = 263,0914$ (12,6 %) $M_2 = 264,0867$ (4,7 %)	 (II)	$263,096 [M_0+H]^+$ (100 %) $264,097 [M_1+H]^+$ (15 %)
(ODTChr) Массы: $M_0 = 278,0837$ (81,7 %) $M_1 = 279,0863$ (12,6 %) $M_2 = 280,0819$ (4,9 %)	 (III)	$279,091 [M_0+H]^+$ (100 %) $280,094 [M_1+H]^+$ (14 %)
Оксотиахром Массы: $M_0 = (81,7 \%) 276,0681$ $M_1 = 277,0707$ (12,6 %) $M_2 = 278,0662$ (4,9 %)	 (IV)	$277,076[M_0+H]^+$ – 41893 $277,0758\text{--}1398$ (100 %) $278,0839[M_0+2H]^+$ 6082

Соединение, масса изотопологов (частота встречаемости)	Структурная формула	m/z молекулярных ионов, относ интенсивность
2,3-охо-Т $M_0 = (81,54 \%) 294,0787$ $M_1 = (12,64 \%) 295,0813$ $M_2 = (5,06 \%) 296,077$	 (V)	$295,0856[M_0+H]^+$ 3847–100%
3-оксо-Т	 (VI)	$m/z = 279,1084 [M]^+$
(TSST) Массы: $M_0 = 562,2144 (66,8 \%)$ $M_1 = 563,2170 (20,7 \%)$ $M_2 = 564,2137 (9,6 \%)$	 (VII)	$563,219 [M_0+H]^+ (100 \%)$ $564,2226 [M_1+H]^+ (23 \%)$
$M_0 = (81,78 \%) 280,0994$ $M_1 = (12,64 \%) 281,1020$ $M_2 = (5,06 \%) 282,0974$	 (VIII)	Тиамин-тиазолон $m/z = 280,09926 [M_0]^+$ $m/z = 281,106 [M_0+H]^+$
$M_0 = (81,54 \%) 297,1021$ $M_1 = (12,64 \%) 298,1047$ $M_2 = (5,06 \%) 299,1005$	 2,4-охо-тиазол-Т (IX)	$m/z = 297,1008 [M_0]^+$

На рис. 1–8 представлены масс-спектры молекулярных ионов продуктов окисления тиамин синглетным кислородом.

Тиамин и его фосфатные эфиры существовать в растворах в виде различных спектрально-различимых ионных и таутомерных форм (рис. 9) [3, 4].

При pH 3,0 или ниже тиамин практически полностью существует в протонированной форме (TH^+) (протонирован атом N-1 пиримидинового компонента тиамин $pK_a = 4,9$).

С ростом pH спектр поглощения претерпевает изменения, связанные с депротонированием атома азота N1' ($pK_a = 4,9$) в аминопиримидиновом цикле формы и образованием монокатиона тиамин (Т) [3, 4].

В нейтральной среде тиамин в растворе практически более, чем на 90 % присутствует в форме с закрытым тиазоловым циклом (Т), количество тиольной формы (TSH) не превышает 2 % от общей концентрации тиамин в растворе. Примерно такое же количество присутствует в растворе трициклической формы тиамин. Окисление синглетным кислородом монокатионной формы Т происходит с образованием продуктов, 2-тиазолон тиамин, 2,4-оксотиазол тиамин (табл. 3), структурные формулы. Тиольная форма тиамин окисляется с образованием дисульфида тиамин. Трициклическая форма тиамин окисляется

синглетным кислородом с образованием тиохрома. Тиохром под действием синглетного кислорода окисляется с образованием оксодигидротиохрома, который окисляется с образованием 2,3-оксотиамина.

Результаты исследования и их обсуждение. Рибофлавин один из компонентов В₂ витаминного комплекса присутствует в живых организмах в свободной форме, а также в виде флавин мононуклеотида (FMN) и флавин аденинмононуклеотида (FAD) во всех аэробных клетках. Эти нуклеотидные формы рибофлавина являются простетическими группами целого класса окислительно-восстановительных ферментов. Флавопротеиды распространены повсеместно.

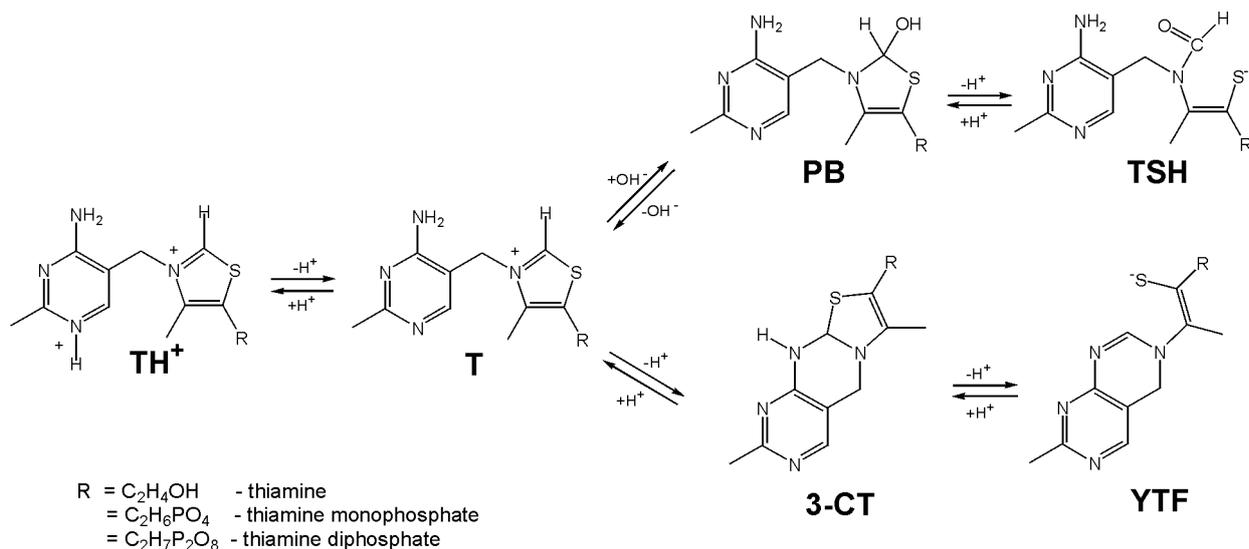


Рисунок 9 — Схема ионных переходов тиамин и его фосфатных эфиров:
 TH⁺ — дикатион, T — монокатион, PB — псевдооснование, TSH — тиольная форма,
 3-CT — трициклическая форма, YTF — желтая тиольная форма

Как известно, рибофлавин, витамин В₂ при облучении видимым светом образует активные формы кислорода [3, 11, 12, 15]. Сенсibilизированные рибофлавином фотохимические реакции, вероятно, протекают также *in vivo*. Рибофлавин поглощает видимый свет, проходящий сквозь кожу, воздействует на структурные компоненты глаза и образует фотовозбужденные состояния, которые генерируют активные формы кислорода, свободные радикалы рибофлавина.

Вероятно, рибофлавин может играть роль эндогенного инактиватора различных патогенов, в том числе вирусов и бактерий, например в крови [9]. Несмотря на то, что нормальная концентрация рибофлавина в тканях мала для значительной фотосенсibilизирующей активности в клеточных структурах, это соединение может быть эндогенным клеточным фотосенсibilизатором в обоих случаях как *in vivo* так *in vitro* [14, 20].

Высокие интенсивности ультрафиолета или видимого излучения в присутствии фотосенсibilизаторов способны генерировать избыточные количества свободных радикалов и активных форм кислорода и вызывать повреждение белковых макромолекул и клеточных структур [9, 14, 16, 20]. В организме человека некоторые нарушения могут быть связаны с одновременным применением фоточувствительных лекарств и фотосенсibilизаторов. Например, интенсивный видимый свет в присутствии фотосенсibilизаторов (витамин В₂) способен уменьшить содержание в крови некоторых биологически активных соединений [6, 15]. Как видно из представленных данных по масс-спектропии, наблюдается окисление тиамин (рис. 1–3), дисульфида тиамин, тиохрома, 2,4-оксо-тиазол-тиамин. Обра-

зование тиохрома под действием видимого света в присутствии рибофлавина (см. рис. 4) происходит вследствие взаимодействия синглетного кислорода с трициклической формой тиамин (см. рис. 5).

Тиохром под действием синглетного кислорода окисляется с образованием оксодигидро-тиохрома (см. рис. 6 и 7), который окисляется с образованием 2,3-оксо-тиамин (см. рис. 8, табл. 2). Окисление монокатионной формы Т-синглетным кислородом происходит с образованием продуктов, 2-тиазолон тиамин, 2,4-оксотиазол тиамин. Ионные и таутомерные формы тиамин представлены на рис. 9.

Как известно, продолжительное воздействие ультрафиолетового излучения на глаза вызывает образование активных форм кислорода, которые наиболее вероятно ответственны за развитие различных дегенеративных процессов, в том числе катаракты. Защитные механизмы против повреждающего действия окислительного стресса, вызванного излучением, включают прямой перехват свободных радикалов, возрастание продукции НАД(Р)Н, поглощение ультрафиолета [21]. Внешняя поверхность роговицы покрыта многослойным эпителием и она играет роль барьера, отделяющего внутренние структуры глаза от внешней среды, препятствует всасыванию слезной жидкости, является фильтром, ослабляющим повреждающее действие ультрафиолетового излучения [5, 10, 21]. Тиамин, тиамин зависимые ферменты, вероятно, играют важную роль в защите роговицы и хрусталика глаза от повреждения активными формами кислорода и азота. В метаболизме роговицы преобладает фосфоглюконатный окислительный путь, который использует более 50 % потребляемой глюкозы. Транскетолаза, тиамин, зависимый ключевой фермент фосфоглюконатного окислительного пути, составляет 10–15 % от общего количества водорастворимых ферментов роговицы мышей. Фосфоглюконатный путь также, наряду с гликолизом, играет важную роль в обмене углеводов в хрусталике [4, 21]. Мы предполагаем, что эти реакции происходят в передней камере глаза, так как она прозрачна для видимого света.

Сразу за роговицей в передней капсуле глаза находится водянистая влага. Это светопреломляющая жидкость, которая омывает радужку и хрусталик. За счет водянистой влаги реализуется транспорт веществ к аваскулярным тканям глаза: именно эта жидкость осуществляет связь между цилиарным телом, пронизанным кровеносными сосудами, и стекловидным телом, и хрусталиком. Обе эти ткани не имеют ни нервов, ни кровеносных и лимфатических сосудов, поскольку должны быть прозрачными для проведения света к сетчатке.

В водянистой влаге содержатся те же вещества, что и в крови. Поэтому при высоком содержании в крови рибофлавина или витаминов В₆ в водянистой влаге также возрастает их концентрация. Синглетный кислород, генерируемый рибофлавином, витаминами В₆ под действием видимого света, может оказывать бактерицидное на загрязненную микробами водянистую жидкость в передней камере глаза и выполнять защитную функцию, в том числе и для хрусталика, так как роговица прозрачна для видимого света и ультрафиолета UVA диапазона. Однако мы показали, что интенсивный видимый свет в присутствии фотосенсибилизатора рибофлавина (витамин В₂) способен уменьшить содержание тиамин и тиаминдифосфата в крови, а также в клеточных структурах глаза. Это связано с тем, что под действием синглетного кислорода происходит образование окисленных продуктов тиамин и тиаминдифосфата, которые содержат карбонильную группу на втором углероде тиазолового компонента и являются структурными аналогами промежуточного переходного состояния нормального кофермента тиамин-зависимых ферментов.

Это структурное соответствие позволяет фосфорилированным карбонильным производным тиамин связываться с высоким средством в 1000–10000 раз, превышающих равновесные константы связывания собственно молекул тиаминдифосфата и эффективно ингибировать активность тиамин-зависимых ферментов и вызывать повреждение и гибель клеточных структур глаза. Например, 2-оксо-тиаминдифосфат (2-охо-TDP) — аналог TDP с карбонильной группой в 2-положении тиазолового цикла — связывается с пируватдегидрогеназой примерно в 20 000 раз сильнее, чем TDP и конкурентно ингибирует данный фермент [13]. В то время как негативный эффект снижения уровня тиамин в тканях может корректироваться приемом повышенных доз тиамин, влияние ингибиторов скорректировать значительно труднее.

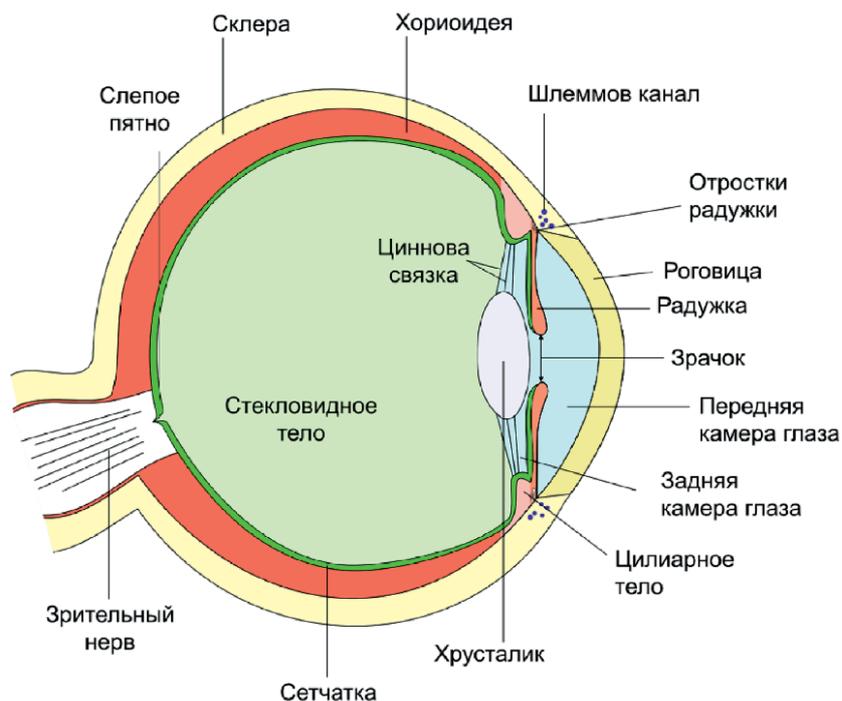


Рисунок 10 — Строение человеческого глаза

Поэтому весьма важным является поддержание высокого уровня тиамин в крови для профилактики развития катаракты и других повреждений клеточных структур глаза при воздействии интенсивного видимого света и ультрафиолета UVA диапазона.

Список литературы

1. Ингибирование тиамин фотолиза тирозина, триптофана, тирозинильных и триптофанильных остатков белков под действием ультрафиолета / И.И. Степура [и др.] // Сб. науч. трудов: Биохимия и молекулярная биология; сб. науч. ст.: вып. 1: Посттрансляционная модификация белков / гл. ред. Л.И. Надольник. — Гродно: ЮрсаПринт, 2017. — С. 68–88.
2. Красновский, А.А. Фотодинамическая регуляция биологических процессов: первичные механизмы, в кн. Проблемы регуляции в биологических системах / А.А. Красновский; под общ. ред. А.Б. Рубина. — М.-Ижевск, 2006. — С. 223–254.
3. Мецлер, Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке / Д. Мецлер // Биохимия. — М.: Мир. — 1980. — Т. 2. — С. 207–209.
4. Основы биохимии / А. Уайт [и др.]. — М.: Мир, 1981. — Т. 3. — 726 с.

5. Островский, М.А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения / М.А. Островский // Успехи биологической химии. — 2005. — Т. 45. — С. 173–204.
6. Фут, Х. Фотосенсибилизированное окисление и синглетный кислород. Биологические следствия. Свободные радикалы в биологии / Х. Фут; под. ред. У. Прайор. — М.: Мир, 1979. — Т. 2. — С. 96–150.
7. Calingasan, N.Y. Vascular endothelium is a site of free radical production and inflammation in areas of neuronal loss in thiamine-deficient brain / N.Y. Calingasan, G.E. Gibson // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2000. — Vol. 903. — P. 353–356.
8. Changes in Nitric Oxide Synthase-Containing Neurons in the Brain of Thiamine-Deficient Mice / H. Matsushita [et al.] // *Acta Histochem. Cytochem.* — 2000. — Vol. 33. — № 2. — P. 67–72.
9. Corbin, F. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an Approach using riboflavins as a Photosensitizer Intern / F. Corbin // *J. Hematology.* — 2002. — Vol. 76, № 2. — P. 253–257.
10. Davies, M.J. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis / M.J. Davies, J.W. Truscott // *J. Photochem. Photobiol.* — 2001. — Vol. 63. — P. 114–125.
11. Edvards, A. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids / A. Edvards, E. Silva // *J. Photobiol. B.:Biol.* — 2001. — Vol. 63. — P. 126–131.
12. Generation and photosensitization properties of oxidized radicals of riboflavin / C.V. Lu [et al.] // *J. Chem. Phys.* — 2004. — Vol. 5. — P. 47–56.
13. Gutowski, J.A. Transition state analogs for thiamin pyrophosphate-dependent enzymes / J.A. Gutowski, E. Gustav, Lienhard // *J. Biol. Chem.* — 1976. — Vol. 251, № 9. — P. 2863–2866.
14. Ibal, J. Photooxidation of acyclovir with thermally generated triplet excited ketones. A comparison with Type I and II photosensitizers / J. Iqbal, A. Husain, A. Gupta // *J. Chem. Pharmac. Bulletin.* — 2006. — Vol. 54, № 4. — P. 519–521.
15. Insinska-Rak, M. Riboflavin Interactions with Oxygen — A Survey from the Photochemical Perspective / M. Insinska-Rak, M. Sikorski // *J. Chem. Eur.* — 2014. — Vol. 20. — № 47. — P. 1–13.
16. Natera, J. Vitamin B₁ as a scavenger of reactive oxygen species photogenerated by vitamin B₂ / J. Natera, W.A. Massad, N.A. Garcia // *J. Photochem. Photobiol.* — 2011. — Vol. 87, № 2. — P. 317–323.
17. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide / I.I. Stepuro [et al.] // *Biochem. (Mosc.)*. — 2012. — Vol. 77, № 1. — P. 41–55.
18. Photosensitized formation of singlet oxygen by vitamins of the B group / B. M. Dzhagarov [et al.] // *J. Applied Spectroscop.* — 1995. — Vol. 62, № 2. — P. 285–289.
19. Stepuro, I.I. Oxidized thiamine derivatives. Mechanisms of formation under exposure to reactive nitrogen and oxygen species and in hemoprotein — catalyzed reactions / I.I. Stepuro, V.I. Stepuro. — LAP LAMBERT Academic Publishing. — 2014. — P. 280.
20. Supramolecular photonic therapeutic agents / S. O. McDonnell [et al.] // *J. American Chem. Soc.* — 2005. — Vol. 127, № 47. — P. 16360–16361.
21. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress / N. Lassen [et al.] // *Seminars in cell and developmental biology.* — Academic Press. — 2008. Vol. 19, № 2. — P. 100–112
22. Thiamine Deficiency in Vivo Produces Fiber Cell Degeneration in Mouse Lenses / H. Peter [et al.] // *J. Biochem. Biophys. Res. Com.* — 1999. — Vol. 258. — P. 703–707.

THIAMINE OXIDATION ON EXPOSURE TO UVA ULTRAVIOLET AND VISIBLE LIGHT IN THE PRESENCE OF RIBOFLAVIN

Aheika S.A.¹, Stepuro I.I.¹, Stsiapura V.I.², Travkina M.³, Yantsevich A.V.³

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus, Grodno, Republic of Belarus;*

²*Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus;*

³*Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

Summary. *In the absence of photosensitizers in the solution, thiamine and its phosphate esters were stable to the exposure to visible light. The radiation of thiamine by visible light as well as by UVA ultraviolet (the wavelength range was 315–400 nm) did not result in changes in its content in the solution and formation of photolysis products. Thiamine and its phosphate esters occurred in the solutions at neutral pH values of the medium as different spectrally differentiated ionic and tautomeric forms. Approximately 97 % fell on the thiamine monocationic form with a closed thiazole ring, while the contents of minor forms such as the thiol, tricyclic and dicationic forms under equilibrium conditions were as low as 2–3 % of the total amount of thiamine in the solution. On exposure of the aqueous thiamine solutions to UVA ultraviolet and visible light ($\lambda > 400$ nm), the thiamine tricyclic form was oxidized to thiochrome ($m/z = 262.0882$) and oxodihydrothiochrome ($m/z = 278.0839$). Under the action of singlet oxygen, the thiamine thiol form was oxidized to form thiamine disulfide ($m/z = 562.2144$).*

On exposure of the thiamine monocation form to singlet oxygen the thiamine oxidized product was formed which contained a carbonyl group on the second carbon of the thiazole component (thiamine thiazolone, $m/z = 280.09926$) and was a structural analog of the intermediate transitional state of a normal coenzyme of thiamine –dependent enzymes. This structural conformity enables phosphorylated carbonyl thiamine derivatives to bind with high affinity, which 1 000 to 10 000 times exceeds the equilibrium binding constants, to thiamine diphosphate molecules, proper, and effectively inhibit the activities of thiamine-dependent enzymes and induce damage and death of eye cellular structures. While the negative effect of the diminished tissue thiamine level can be corrected by intake of high thiamine doses, the effects of the inhibitors can be corrected with greater effort. Therefore it is very important to maintain a high blood thiamine level for prevention of the development of cataract and other damages of eye cellular structures on exposure to intensive visible light and UVA ultraviolet.

ТЭХНІЧНЫ ПРАГРЭС І НОВЫЯ ПЕРСПЕКТЫВЫ ДЛЯ ўЗАЕМАДЗЕЯННЯ ДАНЫХ БІАХІМІЧНЫХ І ГІСТАЛАГІЧНЫХ ДАСЛЕДВАННЯЎ

*Астроўскі А.А.¹, Максімчык Ю.З.¹, Хвесько І.С.¹, Гурыновіч В.А.¹, Туманай А.В.¹,
Палубок В.Ч.¹, Марчык А.І.¹, Астроўская А.Б.², Пракопчык М.І.², Майсяёнак А.Г.¹*

¹*Рэспубліканскае навукова-даследчае ўнітарнае прадпрыемства
«Інстытут біяхіміі біялагічна актыўных злучэнняў Нацыянальнай акадэміі навук»,
г. Гродна, Рэспубліка Беларусь;*

²*Установа адукацыі «Гродзенскі дзяржаўны медыцынскі ўніверсітэт»,
г. Гродна, Рэспубліка Беларусь*

Рэзюмэ. У артыкуле на канкрэтных прыкладах прадэманстравана магчымасць здабыцця дадатковых ведаў у выніку супастаўлення біяхімічных і гісталагічных колькасных даных, атрыманых у даследваннях на лабараторных пацуках.

Уводзіны. Усебакова вывучаць біялагічныя з’явы і медыцынскія праблемы, выкарыстоўваючы шырокі набор даступных метадаў (замест таго, каб абмяжоўвацца, хай сабе і дасканала асвоеным, іх вузкім наборам) — адна з асноўных рыс развіцця бія-медыцынскай навукі ў наш час. Узаемадзеянне даных біяхімічных і марфалагічных даследванняў гарманічна ўпісваецца ў гэты трэнд.

Кожны навуковец, які даўно займаецца марфалагічнымі даследваннямі, можа пацвердзіць, наколькі істотна за апошнія 2–3 дзесяцігоддзі палепшыліся магчымасці для атрымання якасных гісталагічных прэпаратаў, паказальных фотаздымкаў, статыстычнай апрацоўкі лічбавага матэрыялу, выканання іншых этапаў навуковай працы. Аднак і сёння многія біяхімікі ўспрымаюць гісталагаў як асоб, якія могуць узбагачаць іх публікацыі прыгожымі ілюстрацыямі і адным-двума абзацамі апісання гісталагічных прэпаратаў. І толькі.

Тым часам у навуцы мы падыходзім да сітуацыі, калі марфалагі змогуць забяспечваць біяхімікаў не толькі якаснымі фотаздымкамі ды апісаннямі, не толькі прысутнасцю на фота розных структур ці метак, звязаных з малекуламі, якія раней не былі бачнымі, а і аб’ёмным лічбавым матэрыялам, які здольны на новым узроўні характарызаваць морфа-функцыянальны стан біялагічных органаў ды тканак. Прычына ў тым, што, напрыклад, у параўнанні з 1960–80-мі, калі морфаметрыя толькі пачынала ўваходзіць у практыку марфалагічных даследванняў [1, 3], сёння з’явіліся дадатковыя тэхнічныя магчымасці для атрымання якаснага лічбавага матэрыялу. Маём на ўвазе найперш новую мікраскапічную ды камп’ютарную тэхніку і іх праграмаванне [2, 4]. Даная сітуацыя аб’ектыўна дае магчымасць зрабіць наступны крок — забяспечыць атрыманне дадатковых ведаў за кошт узаемадзеяння «біяхімічных і гісталагічных лічбаў». Апошняе асабліва перспектыўна для даследванняў на лабараторных жывёлах невялікага памеру і тых іх органах, з якіх па адным зрэзе можна атрымаць колькасныя даныя, якія здольны характарызаваць з’явы як на арганым, так і тканавым узроўнях іх структурнай арганізацыі.

Мэта даследвання — прадэманстраванаць на канкрэтных прыкладах магчымасць атрымання дадатковых ведаў у выніку супастаўлення біяхімічных і гіста-морфаметрычных даных.

Матэрыялы і метады даследавання. Былі выкананы тры асобныя даследванні.

Першае з іх было зроблена на 32 пацуках-ад'ёмышых, самцах, зыходнай масай каля 80 г, і накіравана на высвятленне ўплыву прэднізалона (ПЗ) ды іншых рэчываў на будову і функцыю надныркавых залоз (ННЗ). Жывёлы былі падзелены на дзве групы па 16 асобін у кожнай. Пацукам на працягу трох тыдняў унутрыстраўнікава штосуткава ўводзілі альбо фізіялагічны раствор хларыда натрыя, альбо прэднізалон, распушчаны ў фізрастворы, у разліку 5 мг/кг масы цела. Дадаткова палове жывёл ў абедзвюх групам давалі вітамін D. Затым жывёл узважвалі і забівалі шляхам хуткай дэкапітацыі, у ходзе якой забіралі кроў для выяўлення канцэнтрацыі кортыкастэрону (КС) і эстроу. Таксама ў пацукоў забіралі левую надныркавую залозу, якую апрацоўвалі для гісталагічнага даследвання. Атрымлівалі цэнтральны зрэз органа (мал. 1), які пасля афарбоўкі гематаксілінам ды эазінам серыйна фатаграфавалі ў мікраскопе *Leica DM 1000* (аб.10х), а затым складалі з асобных фота адзіную панарамную выяву. На апошняй вымяралі ўсю плошчу зрэза ННЗ, а таксама плошчы кары і мазгавога рэчыва, з якіх пазней вылічвалі адносныя памеры даных структур, іх абсалютныя аб'ёмы, таўшчыню кары. Дадаткова ў кары ННЗ на абмежаваным сектары падлічвалі колькасць адрэнакорцікацытаў, ацэньвалі іх аб'ём (мал. 2). Сілу карэляцыйных сувязяў паміж біяхімічнымі і марфаметрычнымі данымі ацэньвалі з дапамогай праграмы *GraphPadPrism (Version 5.00)*.

У другім даследванні было выкарыстана 26 пацукоў-самцоў, масай 300–450 г. Жывёлы былі падзелены на дзве групы — кантрольная (9 шт.) і «дыябетычная» (17 шт.). У жывёл 2-й групы выклікалі цукровы дыябет II тыпа трохмесячнай высокатлушчавай дыетай з наступным увядзеннем стрэптозатацына. Частцы пацукоў гэтай групы дадаткова ўводзілі кампазіцыю «гомеастазін». Жывёл забівалі шляхам хуткай дэкапітацыі. У іх бралі кроў для выяўлення канцэнтрацыі глюкозы (ГЛ). Таксама забіралі левую нырку, якую ўзважвалі і фіксавалі для гісталагічнага даследвання. З нырак выразалі папярочны фрагмент у цэнтральнай частцы, які рыхтавалі для гісталагічнага даследвання. Папярочныя зрэзы органа рабілі так, каб яны праходзілі праз яго адкрытыя вароты. Іх афарбоўвалі гематаксілінам ды эазінам і фатаграфавалі ў мікраскопе *Leica DM6 B* пры выкарыстаньні аб'ектыва 20× у рэжыме аўтаматычнага сканавання. На панарамных фота нырак вымяралі плошчу ўнутранай і вонкавай медулы, кары, падлічвалі ўсе капілярныя клубочки (мал. 4). З гэтых даных выводзілі дадатковыя морфаметрычныя адзнакі. Паколькі ў многіх нырках дыябетычных жывёл прысутнічалі дзістрафічныя каналыцы (мал. 5), вымяралі і іх плошчу. Усе колькасныя даныя апрацоўвалі, як апісана вышэй.

Трэцяе даследванне было выканана на 36 пацуках-самцах масай 160–180 г. Жывёлы былі падзелены на дзве групы па 18 пацукоў у кожнай. Усім ім на працягу двух тыдняў штодзённа ўнутрыстраўнікава ўводзілі альбо фізіялагічны раствор хларыда натрыя, альбо вітамін K_3 (менадыён), распушчаны ў фізрастворы, у дозе 1,3 мг/кг масы. Частцы жывёл абедзвюх груп дадаткова давалі вітамін D_2 ці D_3 . Затым пацукоў забівалі шляхам хуткай дэкапітацыі, забіралі кроў для выяўлення канцэнтрацыі эндатэліна (ЭТ) і остэокальцына. Таксама забіралі селязёнку, у якой з сярэдняй часткі пярэдня-верхняй паловы органа выразалі папярочны ўчастак, які рыхтавалі для гісталагічнага даследвання, як апісана вышэй. Зрэзы фатаграфавалі ў мікраскопе *Leica DM6 B* у рэжыме аўтаматычнага сканавання, выкарыстоўваючы аб'ектыў 10× (мал. 6). На фота вымяралі плошчу зрэза селязёнкі і белае пульпы, падлічвалі колькасць і вымяралі плошчу гермінатыўных цэнтраў (ГЦ; мал. 7). З гэтых параметраў выводзілі вытворныя. Атрыманы лічбавы матэрыял апрацоўвалі як апісана вышэй.

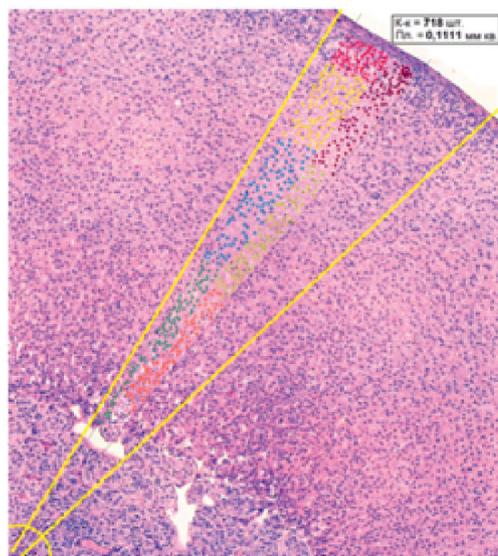
Вынікі даследавання і іх абмеркаванне. У першым даследванні не было выяўлена істотных карэляцыйных сувязяў паміж канцэнтрацыяй эстроу ў крыві пацукоў і лічбавымі па-

раметрамі іх ННЗ. Тое ж назіралася ў дачыненні КС і мазгавога рэчыва гэтых органаў, аднак маса цела жывёл (у дзень забою) і асабліва марфаметрычныя параметры кары ННЗ аказаліся моцна звязанымі станоўчымі карэляцыйнымі сувязямі з канцэнтрацыяй КС у крыві (гл. мал. 6). Прычым, апошняя з’ява практычна аднолькава выразна дэманстравала сябе як у групах жывёл, якія атрымлівалі ПЗ, так і ў тых, якія яго не атрымлівалі (і там, і там ступень развіцця кары ННЗ вызначала канцэнтрацыю КС у крыві, а не наадварот).



Малюнак 1 — Панарамнае фота цэнтральнага зрэза ННЗ пацука

Бачна кара і мазгавое рэчыва органа, яго вена, долькі беллага і бурага тлушчу вакол капсулы. Стрэлка паказвае на астравок карковага рэчыва, які знаходзіцца забрушынна, але за межамі органа

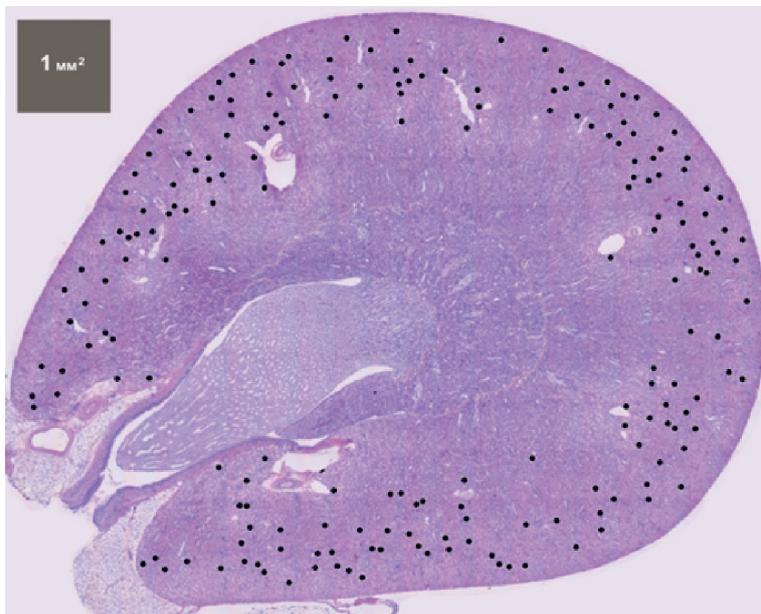


Малюнак 2 — Прыклад выканання падліку колькасці адрэнакорцікацытаў у пэўным сектары кары ННЗ пацукоў

Бачны капсула, кара, мазгавое рэчыва ННЗ (цэнтр апошняга знаходзіцца ў левым ніжнім вугле). Тонкімі чорнымі лініямі абмежаваны сектар кары, плошчай 0,111 мм², на якім розным колерам па 100 штук пазначана 718 ядзер адрэнакорцікацытаў кары

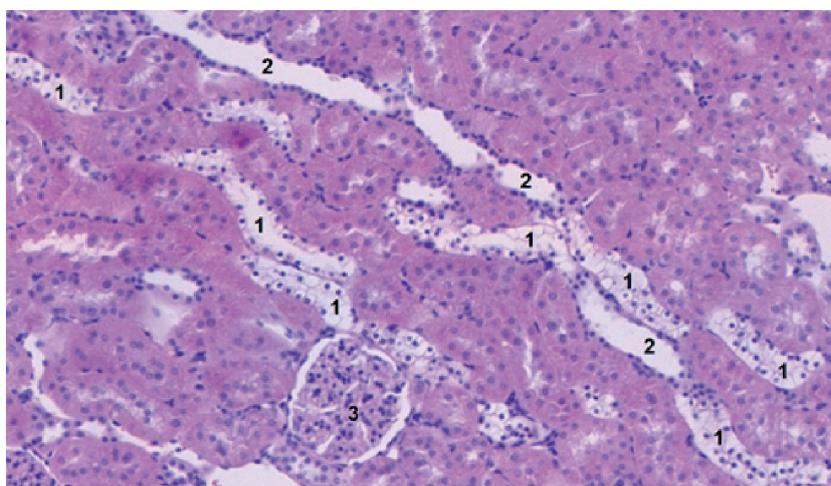
Адзначанае — рэч вядомая. Новым, выяўленым у даследванні, стала тое, што найбольш моцныя карэляцыйныя сувязі аказаліся ў групе пацукоў, якім не ўводзіўся ПЗ, паміж памерам

корцікацытаў і канцэнтрацыяй КС ў крыві, а ў жывёл, якім уводзілі ПЗ, найбольш моцная карэляцыя назіралася паміж колькасцю адрэнакорцікацытаў у іх ННЗ і КС (гл. мал. 6). Апошняе дае права меркаваць, што ўплыў на канцэнтрацыю КС у крыві эксперыментальных жывёл двух даных груп здзяйсняўся з перавагай розных клеткавых механізмаў.

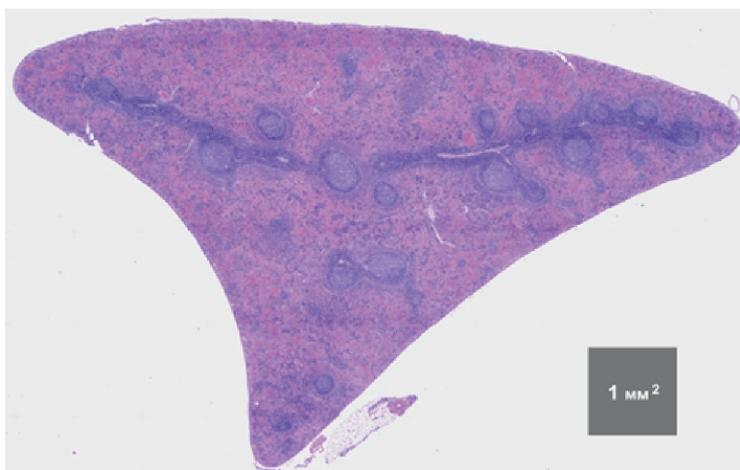


Малюнак 3 — Панарамнае фота фронтальнага зрэза ныркі пацука ў вобласці яе варот
 Чорнымі кружкамі пазначаны капілярныя клубочки кары (197 шт.). Тонкія жоўтыя лініі пазначаюць межы паміж унутранай і вонкавай часткамі медулы органа, а таксама паміж апошняй і карой

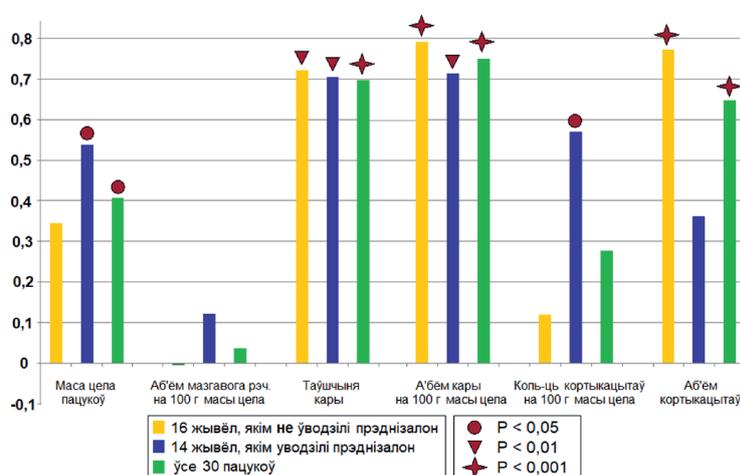
У выніку выканання другога даследвання былі выяўлены карэляцыйныя сувязі паміж канцэнтрацыяй ГЛ ў крыві, з аднаго боку, і адноснай масай нырак, колькасцю капілярных клубочкаў на адзінцы плошчы зрэза кары, ступенню развіцця дзістрафіі яе канальцаў — з другога боку (гл. мал. 7); у даным выпадку па шэрагу прыкмет мела месца вугляводная дзістрафія ўчасткаў дыстальных звітых канальцаў). У адрозненне ад папярэдняга даследвання, дастаткова відавочна, што тут сітуацыя з кірункам сувязі была адваротнай — анамальна вялікая канцэнтрацыя ГЛ у крыві была прычынай выяўленых патамарфалагічных змен, паўсталых у нырках дыябетычных жывёл.



Малюнак 4 — Дзістрафічныя канальцы ў кары ныркі пацука
 Эпітэліяльныя клеткі ў іх сценах маюць светлую цытаплазму. Аб. 20×



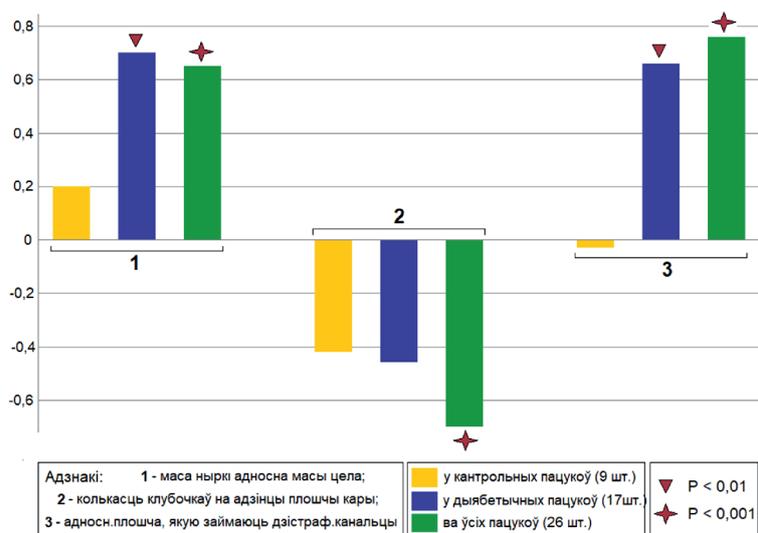
Малюнак 5 — Пярочны зрэд селязёнкі пацука ў сярэдзіне яе пярэдняй паловы
 Бачна чырвоная і белая пульпа органа. Лімфатычныя фалікулы белай пульпы развіваюцца на аснове лімфоідных муфт, якія, у сваю чаргу, акружаюць унутрыселязёнкавыя артэрыі



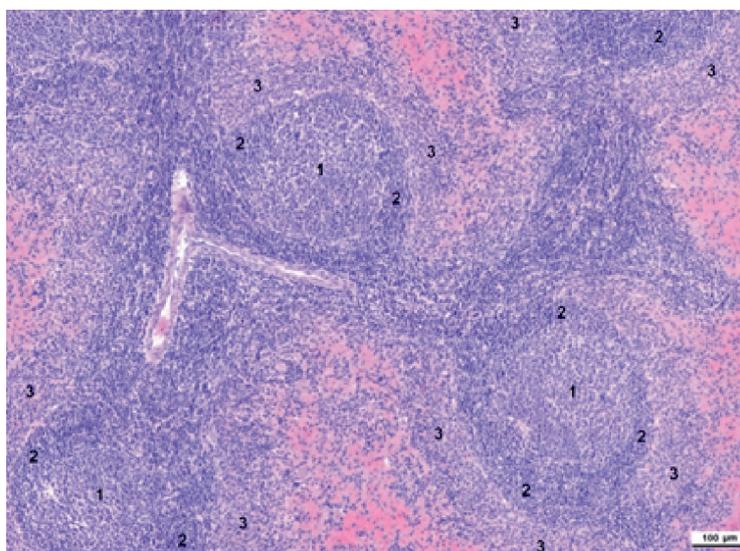
Малюнак 6 — Каэфіцыент карэляцыі паміж канцэнтрацыяй кортыкастэрону ў плазме крыві пацую і некаторымі морфаметрычнымі параметрамі, якія характарызуюць морфа-функцыянальны стан іх ННЗ

У трэцім даследванні не было выяўлена карэляцыйных сувязяў паміж канцэнтрацыяй остэакальцыну, кальцыя, фосфару ў крыві пацую і ступенню развіцця ГЦ у лімфатычных фалікулах іх селязёнак (мал. 8). Затое пэўныя карэляцыйныя сувязі былі выяўлены паміж морфаметрычнымі параметрамі, якія характарызавалі ступень актыўнасці працэсаў імунагенэзу ў селязёнцы, і канцэнтрацыяй ЭТ у крыві жывёл (мал. 9). Існаванне даных сувязяў, з аднаго боку, можа сведчыць (ці пацвярджаць), што ЭТ і праявы імунагенэзу належаць да адзінай сістэмы ўзаемадзеючых чыннікаў у арганізме млекакормячых. Аднак, з іншага боку, гэтыя сувязі аказаліся дастаткова слабымі, што, верагодна, абумоўлена тым, што названыя параметры звязаны паміж сабой не непасрэдна, а праз шэраг іншых чыннікаў.

Абмежаванне памеру артыкула прымушае апусціць некаторыя нюансы і сканцэнтравана на абмеркаванні галоўнага, што вынікае з прыведзеных прыкладаў навуковых даследванняў. Важнейшае ж, на наш погляд, заключаецца ў тым, што нават прасцейшы матэматычны аналіз, які ёсць выяўленне карэляцыйных сувязяў паміж рознымі колькаснымі параметрамі, дазваляе пераканацца ў новых магчымасцях, якія дае тэхнічны прагрэс у навуковай сферы. А менавіта, што:



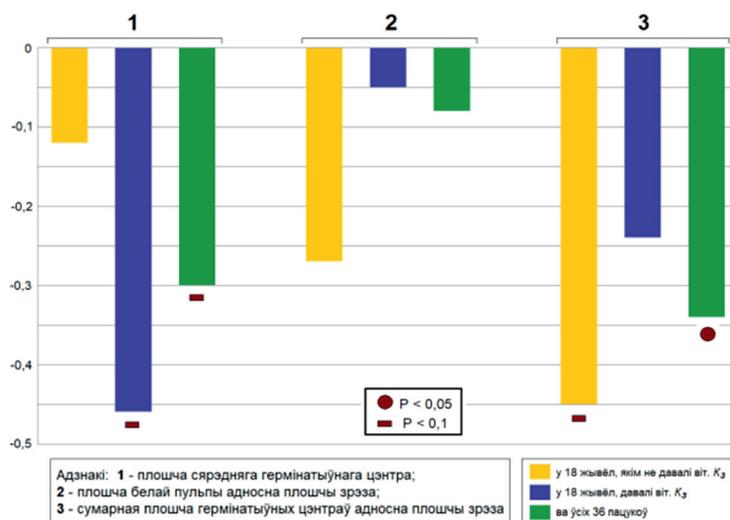
Малюнак 7 — Каэфіцыент карэляцыі паміж канцэнтрацыяй глюкозы ў плазме крыві пацытоў і морфаметрычнымі параметрамі, якія характарызуюць ступень пашкоджання іх нырак ва ўмовах мадэлявання дыябету II тыпу



Малюнак 8 — Лімфатычныя фалікулы селязёнкі ў атачэнні чырвонай пульпы
 Лічбамі пазначаны асноўныя кампаненты фалікулаў: гермінатыўныя цэнтры (1), мантыйная (2) і маргінальная зоны (3)

аналіз узаемадзеяння біяхімічных даных з адпаведнымі колькаснымі гісталагічнымі данымі дазваляе больш поўна і акрэслена вычляняць рэальна сістэмныя сувязі, якія існуюць паміж пэўнымі адзнакамі ў арганізме. Гэта з усёй відавочнасцю спрыяе ўдасканаленню нашых уяўленняў аб механізмах жыццядзейнасці арганізмаў чалавека і жывёл, як ва ўмовах нормы, так і пры развіцці паталагічных працэсаў. У абсалюце, на піку развіцця адзначанага падыходу, можна дайсці да сітуацыі, калі па адным біяхімічным аналізе крыві са шматлікім і дакладным лічбавым матэрыялам можна будзе склацаць уяўленні пра ўсю сістэму паталагічных змен, прысутных у арганізме жывёл і чалавека;

выяўленне моцных карэляцый (калі $r = 7$ і больш) можа быць дасягнута не толькі дзякуючы існаванню рэальных механізмаў звязанасці пэўных адзнак у арганізме, а і абазкова пры ўмове дастаткова дакладнага іх вымярэння. Таму атрыманне высокіх значэнняў хаця б тых жа карэляцыйных сувязяў дае навукоўцам падставы быць ўпэўненымі у выніках сваёй працы.



Малюнак 9 — Каэфіцыент карэляцыі паміж канцэнтрацыяй ЭТ у крыві пацуюў і морфаметрычнымі параметрамі, якія характарызуюць ступень развіцця ГЦ у іх селязёнцы ва ўмовах увядзення у арганізм гэтых жывёл вялікіх доз вітаміна К₃

Заклучэнне. Прапануем навукоўцам-біяхімікам карыстацца, калі гэта магчыма, сучаснымі тэхнічнымі магчымасцямі для атрымання лічбавага матэрыялу з гісталагічных прэпаратаў — крыніцы атрымання дадатковых каштоўных ведаў.

Спіс літаратуры

1. Автандилов, Г. Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Г.Г. Автандилов. — М.: Медицина, 1980. — 216 с.
2. Diller, R.B. Validating whole slide digital morphometric analysis as a microscopy tool / R.B. Diller, R.S. Kellar // *Microsc. Microanal.* — 2015. — Vol. 21, № 1. — P. 249–255.
3. Hans, E. Quantitative methods in morphology / E. Hans, E.R. Weibel. — Berlin : Springer, 1967. — 278 p.
4. Quantitative analysis of histopathological findings using image processing software / Y. Horai [et al.] // *J. Toxicol Pathol.* — 2017. — Vol. 30, №4. — P. 351–358.

TECHNICAL PROGRESS AND NEW PROSPECTS FOR INTERACTION OF BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL DATA

Astrouski A.A.¹, Maksimchyk YU.Z.¹, Khvesko I.S.¹, Gurinovich V.A.¹, Tumanov A.V.¹, Polubok V.Ch.¹, Marchyk A.I.¹, Astrouskaya A.B.², Prakopchyk M.I.², Maysayyonak A.G.¹

*¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds,
 NAS of Belarus,*

Grodno, Republic of Belarus;

*²Grodno State Medical University,
 Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The article demonstrates the possibility of gaining additional knowledge by comparing the biochemical and histological quantitative data obtained in studies on laboratory rats.*

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КВЕРЦЕТИНА И ЕГО НАНОКОМПЛЕКСА С ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ НА ГОТОВНОСТЬ РЕЦЕПТИВНОГО ЛОЖА К ПРИНЯТИЮ КОЖНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

*Бакунович А.А.¹, Ерошенко Ю.В.¹, Радута Е.Ф.¹,
Сидорович Е.А.², Буко В.У.¹, Островский А.А.¹*

¹Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие

«Институт биохимии биологически активных соединений

Национальной академии наук Беларуси»,

г. Гродно, Республика Беларусь;

²Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,

г. Гродно, Республика Беларусь

Резюме. Цель работы — оценка готовности поверхности полнослойного кожного дефекта, предварительно обработанного кверцетином или его комплексом с производным β -циклодекстрина, к приживлению кожных аутотрансплантатов. Для этого нами была разработана авторская модель с забором аутотрансплантата из ушной раковины крыс. Выяснено, что предварительная обработка рецептивного ложа кверцетином или его наноконкомплексом не оказывает существенно-го негативного влияния на приживление трансплантатов

Введение. В клинических условиях врачу не всегда удается однозначно выбрать тактику лечения ран пациента. Причиной этого может быть, например, хроническое воспаление, сложная картина раневого процесса, для которого характерны черты различных фаз процесса заживления в одно и то же время [1]. По тем или иным причинам стратегия терапии кожной раны может меняться: лечение раны без трансплантации (консервативное лечение) не всегда бывает успешным и в некоторых случаях для заживления раны требуется трансплантация кожного лоскута [2, 3].

Ранее нами был выявлен положительный эффект кверцетина (КВ) и особенно его комплекса с производным β -циклодекстрина (КВЦД) на заживление полнослойной кожной раны (ПКР) [4, 5]. Однако при использовании этих веществ на поверхности ПКР остаются частицы КВ. В связи с этим возникает вопрос: насколько эти частицы могут помешать приживлению трансплантата при переходе от консервативного лечения к оперативному (с трансплантацией)?

В настоящей работе нами представлено исследование, позволяющее ответить на поставленный вопрос. С этой целью была разработана оригинальная модель аутотрансплантации кожи у крыс, оценена ее эффективность и возможность применения трансплантации после консервативного лечения кверцетином и его комплексом с β -циклодекстрином.

Материалы и методы исследования. В исследовании было использовано 55 самок крыс породы Wistar массой 180–260 г, которые находились в индивидуальных клетках. На всех этапах моделировалась ПКР с подшиванием защитной камеры. Все манипуляции с животными, требующие их обезболивания или обездвиживания, выполнялись под эфирным наркозом.

У всех животных в межлопаточной области удаляли шерсть, после чего кожу промывали водой и высушивали. Затем наносили метку, по которой к коже подшивали защитную камеру.

После этого на коже по центру камеры ставили квадратную метку площадью $1,0 \text{ см}^2$, по которой ножницами создавали ПКР.

Исследование было проведено в три этапа:

на первом этапе выяснялось, в какой степени ингибируется контракция раны (ИКР) в зависимости от площади трансплантатов (St), размещенных на ее поверхности. Для этого на ПКР пересаживали разное количество ауто трансплантатов (АТ);

на втором этапе определялось, в какой степени АТ ИКР в зависимости от времени, которое прошло с момента их отделения от донорского участка и до пересадки на рецептивное ложе раны (РЛ). При этом АТ находились в физиологическом растворе от 0,5 ч до 48 ч при температуре $+21 \text{ }^\circ\text{C}$;

на третьем этапе выяснялось, в какой степени частицы КВ, оставшиеся на поверхности ПКР (после нанесения КВ и КВЦД на РЛ в течение трех суток), могут повлиять на приживляемость АТ. Последнее оценивали также по тому, в какой степени АТИКР.

В качестве источника АТ была выбрана ушная раковина лабораторных крыс. Нами было выявлено, что кожа внутренней поверхности ушной раковины этих животных характеризуется малой и стандартной толщиной, слабым развитием волосяных фолликулов, а также другими чертами, которые позволяют легко изготавливать из него АТ необходимого размера и формы. При получении АТ из ушной раковины, установлено, что наружный слой ушной раковины иногда надрывается, легко травмируется, сминается и теряет структуру, поэтому для дальнейшей работы в качестве донорского участка был выбран внутренний слой.

Через различное время (на первом и втором этапе через 2 суток, на третьем этапе через 3 суток) после моделирования ПКР были подготовлены АТ и посажены на РЛ. АТ изготавливались в день трансплантации (первый и третий этап) либо за необходимое время до трансплантации (второй этап).

Для забора АТ животные вводились в состояние эфирного наркоза, и при помощи ножниц у каждой крысы забирали ушную раковину. Далее при помощи пинцетов их разделяли на 2 слоя. Внутренний слой размещали на капле физиологического раствора в чашке Петри, под которой лежал бумажный лист в клетку. При помощи стерильного бритвенного лезвия, ориентируясь на размер клеток, вырезали квадратный АТ площадью около $1,0 \text{ см}^2$. Далее в зависимости от того, к какому этапу и группе принадлежало животное, из первоначального квадрата вырезали окончательные АТ. После операции рану закрывали четырьмя марлевыми дисками, на которые наносили 200 мкл физраствора (на третьем этапе опытным группам наносили 200 мкл КВ или КВЦД, но лишь до момента трансплантации; после наносили физраствор), а сверху помещали марлевый тампон. Камеру прикрывали алюминиевой крышкой, которую фиксировали резинками.

Перевязки проводились ежедневно до заживления раны. При этом область раны фотографировали и затем по фотографиям измеряли площади раны, ориентируясь на край интактной кожи (Sp), а также St. В качестве ключевого параметра использовалась Sp через 17 суток (первый этап) и 30 суток (второй и третий этапы) после трансплантации.

На первом этапе исследованные животные были поделены на 4 группы по количеству АТ и St. Крысам 1-й группы ($n = 5$) на РЛ переносили один АТ, St которого была $0,11 \text{ см}^2$; животным 2-й группы ($n = 4$) на рану помещали три Т по сагиттальной линии, общая St = $0,33 \text{ см}^2$; животным 3-й группы ($n = 5$) — 9 Т, общая St = $1,0 \text{ см}^2$; в 4-ю группу входило 6 контрольных животных, которым не проводили трансплантацию.

На втором этапе животные были поделены на 4 группы (животным пересаживали по 4 АТ общей St = 1 см^2): у 1-й группы (5 крыс) — АТ хранились в физрастворе в течение 0,5 ч (кон-

трольная группа); АТ для животных 2-й группы (5 крыс) хранились в течение 6 ч; в 3-й группе (5 крыс) — в течение 24 ч; в 4-ю группу входило 5 крыс, для которых время хранения АТ до трансплантации составило 48 ч.

На третьем этапе животным через трое суток с момента создания ПКР на РП пересаживали по 9 Т с общей $St = 1 \text{ см}^2$. Перед этим они были разделены на 3 группы. Группу 1 составили 5 крыс, которым на рану наносился физраствор (контрольная группа). Животным группы 2 (5 крыс) — на рану наносился КВ. Пяти крысам из 3-й группы на рану наносился КВИД. Субстанции готовили по методике, описанной Savic и соавт. [6].

Статистическую обработку проводили с помощью программы Prism 6, достоверность отличий между группами оценивали по непарному t-тесту.

Все работы с животными были выполнены в соответствии с ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014, а также ТКП 125–2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика».

Результаты исследования и их обсуждение. Принципиальная особенность динамики заживления ран у животных первого этапа исследования представлена на рис. 1. На нем отражена закономерность: чем больше общая St , тем в большей степени происходит ИКР.

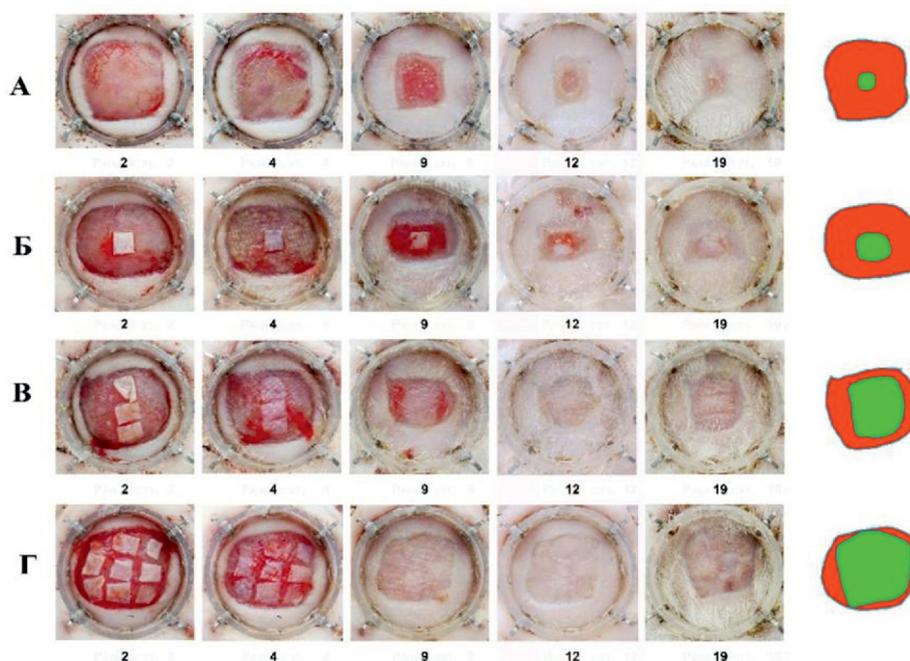


Рисунок 1 — Пример заживления раны у животных, использованных на первом этапе исследования:

А — серия фото, расположенная по горизонтали; показано, как заживает ПКР без трансплантации; животное группы 4 (контрольная), Б — пример животного группы 1 (пересаживался АТ площадью $0,11 \text{ см}^2$), В — пример животного группы 2 (пересаживался АТ общей площадью $0,33 \text{ см}^2$), Г — пример животного группы 3 (пересаживался АТ общей площадью $1,0 \text{ см}^2$); цифрами указаны сутки после переноса АТ на ПКР; справа изображены контуры области, ограниченной линией по краю интактной кожи через 2 суток после создания ПКР (красный цвет) и через 19 суток с момента создания ПКР (зеленый цвет)

График изменения S_p относительно S_p через 2 суток с момента создания ПКР на протяжении 19 суток с момента ее создания отображен на рис. 2. Видно, что чем больше St , тем раньше S_p в опытных группах начинают становиться достоверными при сравнении с контрольной группой.

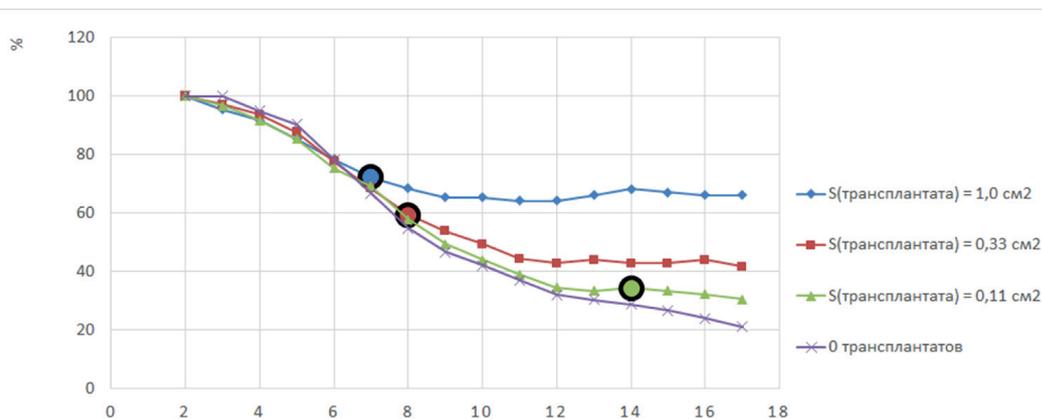


Рисунок 2 — Влияние S_t на динамику контракции раны (%) в зависимости от S_t : круглыми маркерами обозначены сутки с момента создания ПКР, через которые S_p становится статистически достоверной по отношению к S_p группы «0 трансплантатов», $p < 0,05$

Таким образом, полученные на этом этапе данные показывают, что степень ИКР зависит от количества и эффективности приживляемых Т.

На втором этапе исследования было установлено, что при хранении Т в температуре $+21^\circ\text{C}$ в течение 0,5 ч, жизнеспособность АТ была максимальной. При их хранении в течение 6 и более часов ИКР постепенно уменьшалось (рис. 3).

Таким образом, в условиях данной модели, при хранении АТ перед трансплантацией при комнатной температуре в течение 6 и более часов, способность АТ к ИКР ухудшается в связи со снижением их жизнеспособности.

В результате третьего этапа исследования было установлено, что нанесение растворов КВ и КВЦД не привело к статистически достоверной разнице S_p между группами через 30 суток с момента трансплантации (рис. 4).

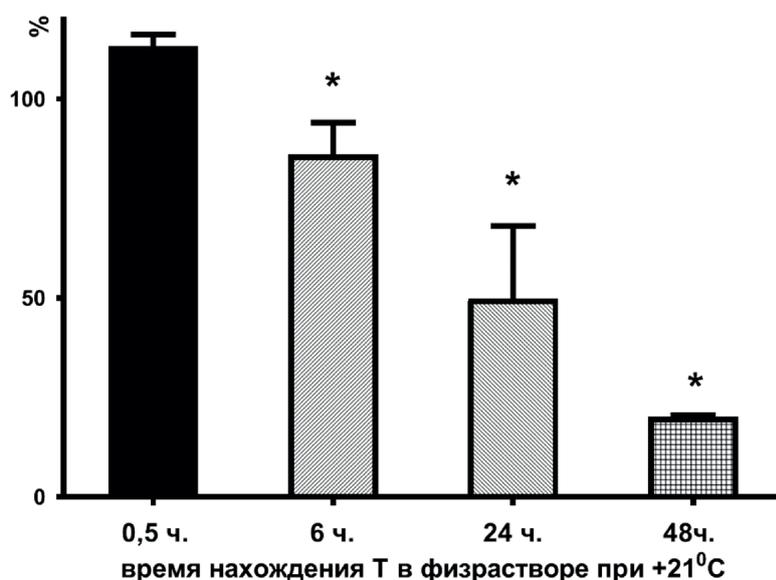


Рисунок 3 — S_p через 30 суток с момента трансплантации относительно S_t в день трансплантации в зависимости от времени нахождения АТ в физрастворе при комнатной температуре, %

* — статистически достоверное различие по сравнению с группой 1, $p < 0,05$

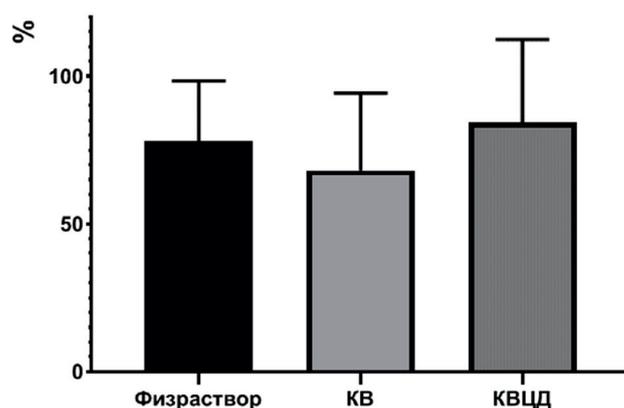


Рисунок 4 — Sp через 30 суток с момента трансплантации относительно St в день трансплантации, % в зависимости от наносимого вещества: физраствор, КВ или КВЦД

Заключение. Подтверждена возможность изготовления АТ из тканей внутренней поверхности ушной раковины лабораторных крыс.

Выяснено, что ингибирование контракции раны пропорционально St, размещенной на ПКР.

Показано, что АТ, хранящийся в физрастворе при комнатной температуре с момента забора до трансплантации менее 0,5 ч, полностью сохраняет свою жизнеспособность. При хранении АТ в этих условиях 6 и более часов, уменьшится их способность ингибировать раневую контракцию, что свидетельствует о снижении их жизнеспособности.

Нанесение на ПКР в течение 3 суток растворов КВ или КВЦД существенно не влияет на приживляемость АТ и ингибирование ими контракции. Последнее означает вероятность того, что в клинических условиях после применения КВ или КВЦД для стимуляции процессов заживления раны тактика консервативного лечения может быть заменена на оперативную тактику заживления с трансплантацией без существенных негативных последствий для приживления АТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ, договор № М19М-145, № гос. регистрации 20191840).

Список литературы

1. Глухов, А.А. Патопфизиология длительно незаживающих ран и современные методы стимуляции раневого процесса / А.А. Глухов, М.В. Аралова // *Новости хирургии.* — 2015. — Т. 23, № 6. — С. 673–679.
2. Липатов, К.В. Значение ауто трансплантации расщепленной кожи в гнойной хирургии / К.В. Липатов, Е.А. Комарова // *Трансплантология.* — 2012. — № 1–2. — С. 5–9.
3. Об утверждении клинического протокола лечения глубоких ожогов кожи методом трансплантации [Электронный ресурс] : приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 24 марта 2011 г., № 293 // *Нормативно-правовые документы Республики Беларусь.* — Режим доступа: <http://zakonby.net/prikaz/50923-prikaz-ministerstva-zdravoohraneniya-respubliki-belarus-ot-24032011-n-293-quotob-utverzhenii-klinicheskogo-protokola-lecheniya-glubokih-ozhgov-kozhi-metodom-transplantaciiquot-vmeste-s.html>. — Дата доступа: 03.06.2020.
4. Ранозаживляющие и иммуномодулирующие свойства наноконцентрации кверцетина с гидроксипропил-β-циклодекстрином [Электронный ресурс] / А. А. Бакунович [и др.] // *Кислород и свободные радикалы : сборник материалов международной научно-практической конференции, Гродно, 15–16 мая 2018 г. / ГрГМУ ; под ред. В.В. Зинчука.* — Гродно : ГрГМУ, 2018. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). — С. 10–12.

5. Уплыў кверцэтына і яго камбінацыі з цыкладэкстрынам на загойванне апёкавых ран у лабараторных пацукоў / А.А. Бакунович [и др.] // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. — 2019. — Т. 16, №4. — С. 410–423.

6. Investigation of properties and structural characterization of the quercetin inclusion complex with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin / I.M. Savic [et al.] // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. — 2015. — Vol. 82, №3. — P. 383–394.

ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF QUERCETIN AND ITS NANOCOMPLEX WITH CYCLODEXTRIN ON THE READINESS OF RECEPTIVE BED TO ACCEPTANCE OF SKIN GRAFT

*Bakunovich A.A.¹, Yeroshenko Yu.V.¹, Raduta Ye.F.¹,
Sidorovich Ye.A.², Buko V.U.¹, Ostrovsky A.A.¹*

*¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
of the NAS of Belarus, Grodno, Republic of Belarus;*

²Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Summary. *This study was aimed to assess how susceptible to the engraftment with skin autografts is the wound surface treated preliminary with quercetin or its complex with β -cyclodextrin derivative. Especially for this purpose, we have developed an author's experimental model with a graft taken from the rat's ear. The data obtained suggested that the pre-treatment of receptive bed with quercetin or its nanocomplex did not have a significant negative effect on the engraftment of skin autograft.*

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПЕЧЕНИ ПРИ ВВЕДЕНИИ КОМПЛЕКСА БЕРБЕРИНА С ПРОИЗВОДНЫМ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС

*Белоновская Е.Б., Нарута Е.Е., Лукивская О.Я., Мороз В.Л.,
Кузьмицкая И.А., Ерошенко Ю.В., Кирко С.Н., Буко В.У.*

*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. На модели алкогольного стеатогепатита у крыс изучены гепатозащитные свойства берберина и его супрамолекулярного комплекса с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином. Показано, что комплексованная форма берберина, в отличие от его монопрепарата, обладает более выраженной гиполипидемической активностью, снижая степень стеатоза, а также оказывает противовоспалительное действие, способствуя значительному уменьшению признаков воспаления паренхимы печени и уровня ключевого провоспалительного цитокина α -ФНО.

Введение. В последнее время наблюдается стремительный рост заболеваний печени, ассоциированных с употреблением алкоголя, что представляет собой социальную и медицинскую проблему глобального масштаба. Распространенность алкогольного стеатогепатита (АСГ) в популяции достаточно велика, заболевание встречается в 15–25 % (по другим источникам — 20–40 %) случаев [2, 7] имеет непрогнозируемое течение и высокий риск развития фатальных осложнений.

АСГ, являясь одной из форм алкогольной болезни печени (АБП), представляет собой хроническое воспаление печени на фоне жировой трансформации гепатоцитов, вызванное токсическим воздействием этанола и продуктами его распада. Воспалительная реакция характеризуется наличием очагов инфильтрации и некрозов гепатоцитов в паренхиме печени. Особенностью воспалительного инфильтрата при АСГ является преобладание полиморфноядерных лейкоцитов над количеством лимфоцитов. Важную роль в развитии АСГ играет нарушение баланса в секреции про- и противовоспалительных цитокинов [8]. Активация синтеза и избыточный выброс основного агрессивного провоспалительного цитокина α -ФНО, на фоне стеатоза печени, оказывает системное и локальное действие, мобилизуя выход воспалительных клеток из кровяного русла в печень и тем самым инициируя воспалительный процесс, приводящий к многочисленным нарушениям, ассоциированным с АСГ [6]. Устойчивое воспаление паренхимы печени является ключевым для прогрессирования АСГ в фиброз/цирроз печени.

Выбор гепатопротектора для лечения стеатогепатита алкогольной этиологии представляется весьма сложной задачей. Несмотря на многообразие препаратов, используемых для фармакотерапии АСГ, эффективность большинства из них сомнительна из-за возникающих побочных эффектов. В последнее время особый интерес представляет использование препаратов природного происхождения, обладающих широким спектром биологического действия, низкой токсичностью, а следовательно возможностью применения в течение длительного периода,

доступным ценовым диапазоном. К таковым относится изохинолиновый алкалоид берберин, являющийся основным действующим веществом растений семейства Ranunculaceae, Rutaceae, Berberidaceae. Последние исследования показали, что берберин обладает антиоксидантным, противовоспалительным, гиполипидемическим, гипогликемическим, противоопухолевым действием [5, 10, 11]. В экспериментах на мышах продемонстрирована гепатопротективная и антифиброзная активность берберина, связанная с подавлением активации звездчатых клеток [1, 4].

Однако берберин, имеющий широкий спектр биологического действия, обладает низкой биодоступностью и как результат — недостаточной абсорбцией из кишечника, особенно при наличии воспалительного процесса в печени [3, 9]. В связи с этим перспективным является использование биологических систем (липосом, мицелл, наногелей) в качестве способа направленной доставки лекарственного средства с целью повышения его водорастворимости, а следовательно, биодоступности и усиления фармакологической активности. В последнее время β -циклодекстрины рассматриваются в качестве наиболее многообещающих супрамолекулярных капсул.

Целью настоящего исследования явилось изучение гепатопротективного действия берберина и его супрамолекулярного комплекса с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином (2-HP- β -CD) при экспериментальном АСГ.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar с массой тела к началу опыта 230–250 г. Алкогольный стеатогепатит (АСГ) моделировали принудительным ежедневным внутрижелудочным (в/ж) введением 30%-го раствора этанола в дозе 4 г/кг массы тела, в утреннее время, в течение 8 недель на фоне высокожировой диеты (ВЖД), содержание жирового компонента которой составляло 32 %. Все эксперименты с соблюдением этических норм обращения с лабораторными животными, с учетом всех требований «Всемирного общества защиты животных (WSPA)» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (18.03.1986, пересмотр 02.12.2005, Страсбург), а также Директивы 86/609/ЕЕС «Защита животных, используемых в научных целях» (в редакции от 05.05.2009, Страсбург).

Методом случайной выборки животные были разделены на следующие группы: 1-я группа — контрольная, содержащаяся на стандартном рационе вивария; 2-я — АСГ; 3-я — АСГ и введение водного раствора берберина (свежеприготовленный, при подогреве) в дозе 100 мг/кг (Berberine chloride hydrate, Sigma-Aldrich, USA); 4-я — АСГ и введение супрамолекулярного комплекса берберина с 2-HP- β -CD (CycloLab R@D Ltd, Budapest). Для приготовления комплекса его компоненты (берберин и 2-HP- β -CD, в молярном соотношении 1:1) растворяли в воде при тщательном перемешивании. Препараты вводили во второй половине дня, ежедневно, в/ж на протяжении последних 4 недель опыта. Животных выводили из опыта через сутки после введения препаратов, проводили забор образцов ткани печени и крови для получения сыворотки.

Для проведения гистологического исследования с помощью световой микроскопии часть фрагментов правой доли печени крыс фиксировали в 10%-м забуференном формалине с последующей проводкой по стандартной методике и заливкой в готовую парафиновую среду. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином Лилли-Майера и эозином (Н/Е) для обзорных исследований грубых морфологических нарушений. Другую часть образцов ткани печени замораживали в жидком азоте. Криостатные срезы толщиной 15 мкм для проведения гистохимического исследования с целью оценки степени аккумуляции липидов в печени окрашивали специальным методом при помощи судана черного Б. Исследование микропрепаратов, морфометрию и микро-

фотографирование проводили с помощью светового микроскопа Olympus CX-41, оснащенного цифровой фотокамерой Olympus C5660 (Япония). Определение площади соединительной ткани проводили с помощью компьютерной системы анализа изображения ImageJ (NIH, USA). Морфометрический анализ проводили согласно общепринятым рекомендациям.

Содержание α -ФНО в сыворотке крови крыс определяли методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA, R&D Systems, USA).

Содержание триглицеридов определяли с помощью наборов реактивов «Анализ-Х» (Минск, Беларусь).

Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m). Существенность различий оценивали по U-критерию Манна — Уитни. Статистически значимыми считали различия с ($P < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. При гистологическом исследовании печени животных контрольной группы патологических изменений в структуре не выявлено. При окраске суданом выявлена незначительная суданофилия (рис. 1А).

Длительное введение этанола на фоне кормления ВЖД приводило к морфологическим изменениям в печени, характерным для АСГ. Дисциркуляторные нарушения характеризовались наличием расширенных центральных вен и синусоидов, их полнокровием. В печени наблюдались признаки мелко- и среднекапельной жировой дистрофии гепатоцитов; жировые включения диффузно располагались во всех отделах печеночной дольки, при этом особо интенсивное суданофильное окрашивание отмечалось в 3 зоне печеночного ацинуса (перивенулярно). Относительная площадь суданофилии, свидетельствующая о степени аккумуляции липидов в печени, превышала контрольные значения в 11 раз. Обнаружена выраженная очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация в области портальных трактов с примесью нейтрофилов, множественные внутريدольковые инфильтраты мелких, средних и крупных (занимающие 1/3 поля зрения) размеров, очаги некрозов в центральных отделах долек, что свидетельствует о высокой степени воспалительной реакции в печени (рис. 1Б).

В ходе биохимического исследования в сыворотке крови выявлено резкое повышение уровня агрессивного провоспалительного цитокина α -ФНО в 1,8 раза. В печени животных с хронической алкогольной интоксикацией содержание триглицеридов возрастало в 1,6 раза.

При введении берберина и его супрамолекулярного комплекса животным с АСГ характер патологических изменений существенно не отличался от опытной группы, при этом степень стеатоза заметно уменьшалась (рис. 1В и 1Г). Следует отметить, что у животных обеих групп, получавших препараты, наблюдалась преимущественно мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов. Результаты морфометрического исследования показали достоверное снижение относительной площади суданофильного окрашивания при введении берберина и его комплекса на 29 % и 42 %, соответственно. Уменьшение данных показателей свидетельствует о значительном уменьшении степени аккумуляции липидов в печени, причем действие комплекса, в отличие от монопрепарата, было особо выраженным. Воспалительная инфильтрация портальных трактов сохранялась в печени животных обеих групп, однако имела диффузный характер. Наблюдались внутридольковые воспалительные инфильтраты малых и средних размеров. В печени животных, получавших комплексированную форму берберина, количество очагов воспаления было незначительным.

Анализ уровня провоспалительного цитокина показал, что введение берберина и его супрамолекулярного комплекса снижает содержание α -ФНО на 18 % и 36 % соответственно, при-

чем эффект комплексированной формы был особо выражен по сравнению с применением берберина в свободном виде.

Также отмечено достоверное уменьшение количества триглицеридов в печени под влиянием обеих форм берберина (табл. 1).

Проведенные исследования свидетельствовали о гепатопротективном действии берберина и особенно его комплекса с 2-HP- β -CD. Более выраженное гепатозащитное действие последнего обусловлено, вероятно, его большей биодоступностью и усилением биологической активности, что делает комплекс эффективнее монопрепарата.

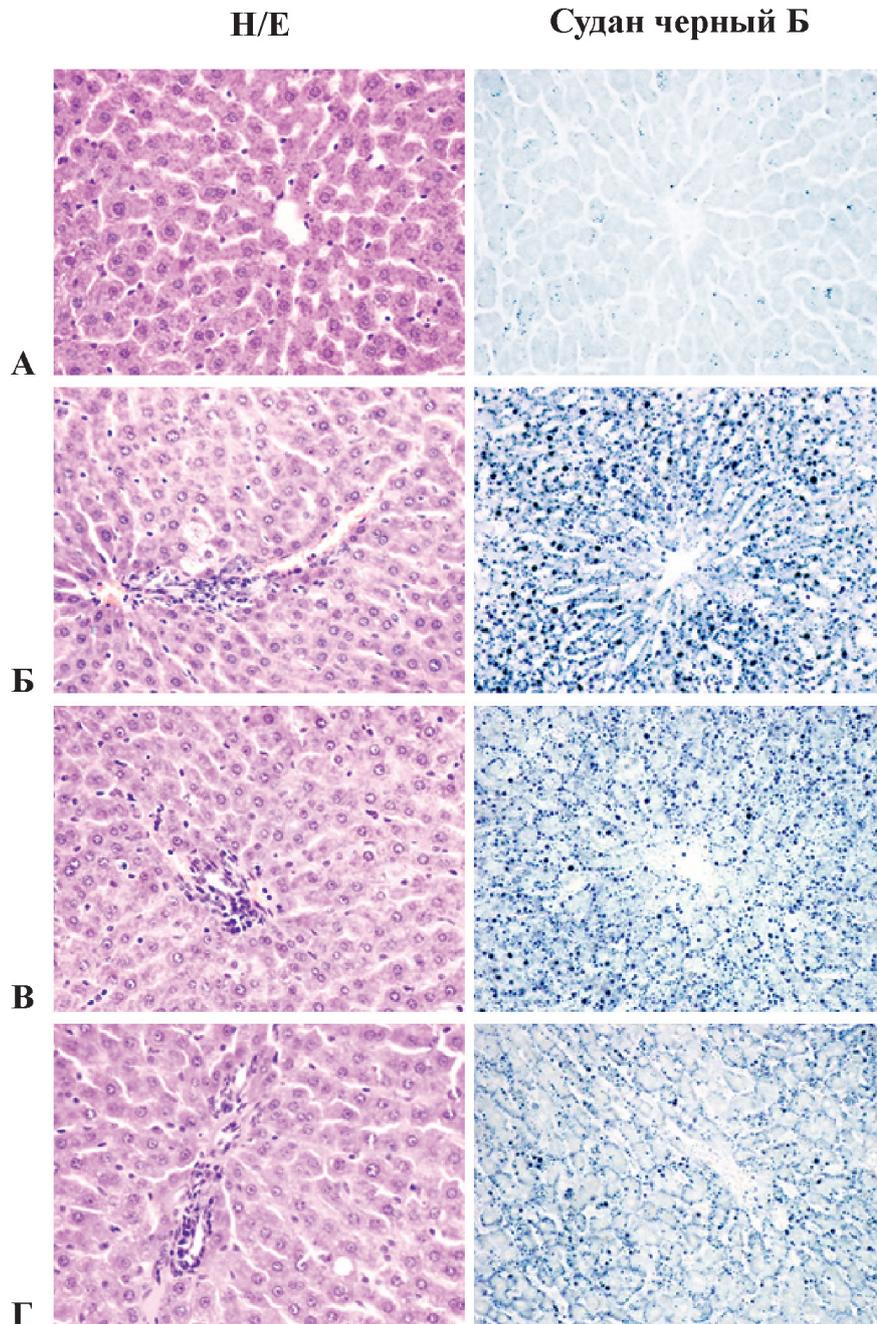


Рисунок 1 — Гистологическая картина печени:

- А) Контрольная группа: структура печени не нарушена, незначительная суданофилия;
Б) АСГ: стеатоз и лимфогистиоцитарная очаговая инфильтрация; выраженная суданофилия; В) АСГ + берберин; Г) АСГ + супрамолекулярный комплекс; уменьшение стеатоза и суданофилии.

Окраска Н/Е, суданом черным Б, объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$

Таблица 1 — Площадь суданофильного окрашивания и содержание α -ФНО в сыворотке крови крыс с АСГ, получавших берберин и его супрамолекулярный комплекс

Показатель	Контроль	АСГ	АСГ + берберин	АСГ + комплекс
Печень				
Относительная площадь суданофильного окрашивания, %	1,23 ± 0,13	13,55 ± 1,32 ^a	9,62 ± 1,25 ^{ab}	7,86 ± 2,2 ^{ab}
Триглицериды, мг%	1807 ± 41,0	2899 ± 57,9 ^a	2596 ± 89,1 ^{ab}	2578 ± 80,9 ^{ab}
Сыворотка				
α -ФНО, пг/мл	10,36 ± 0,49	18,86 ± 1,52 ^a	15,45 ± 2,12 ^a	11,98 ± 1,82 ^b

Примечание: ^a — статистически значимое отличие от контрольной группы животных; ^b — статистически значимое отличие от группы животных с АСГ; ^c — статистически значимое отличие от группы животных, получавшей берберин.

Заключение. Таким образом, полученные результаты исследования показали, что берберин и его супрамолекулярный комплекс с 2-HP- β -CD в условиях экспериментального АСГ обладали гепатопротективным действием, проявляя гиполипидемическую и противовоспалительную активность, причем эффект комплекса был более выраженным. Об этом свидетельствовало улучшение морфологической картины печени, характеризующееся снижением стеатоза и воспаления паренхимы печени, а также уменьшение уровня ключевого провоспалительного цитокина α -ФНО.

Список литературы

1. Berberine inhibits hepatic stellate cell proliferation and prevents experimental liver fibrosis / X. Sun [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* — 2009. — Vol. 32. — P. 1533–1537.
2. Celli, R. Pathology of Alcoholic Liver Disease / R. Celli, X. J. Zhang // *J. Clin. Transl. Hepatol.* — 2014. — Vol. 2. — P. 103–109.
3. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: an update / A. Kumar [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* — 2015. — Vol. 761. — P. 288–297.
4. Hepatoprotective effects of berberine on liver fibrosis via activation of AMP-activated protein kinase / J. Li [et al.] // *Life Sci.* — 2014. — Vol. 98, № 1. — P. 24–30.
5. Imanshahidi, M. Berberis vulgaris and berberine: An update review / M. Imanshahidi, H. Hosseinzadeh // *Phytother. Res.* — 2016. — Vol. 30, № 11. — P. 1745–1764.
6. Neuman, M.G. Cytokines — central factors in alcoholic liver disease / M.G. Neuman // *Alcohol Res. Health.* — 2003. — Vol. 27, № 4. — P. 307–316.
7. Orman, E.S. Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy / E.S. Orman, G. Odena, R. Bataller // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2013. — Vol. 28, № 1. — P. 77–84. O’Shea, R.S. Alcoholic liver disease / R.S. O’Shea, S. Dasarathy, A.J. McCullough // *Hepatol.* — 2010. — Vol. 51. — P. 307–328.
8. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability / C.S. Liu [et al.] // *Fitoterapia.* — 2016. — Vol. 109. — P. 274–282.
9. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects / K. Wang [et al.] // *Drug Metab. Rev.* — 2017. — Vol. 49, № 2. — P. 139–157.
10. Vuddanda, P.R. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities / P. R. Vuddanda, S. Chakraborty, S. Singh // *Expert Opin. Investig. Drugs.* — 2010. — Vol. 19. — P. 1297–1307.

CHARACTERIZATION OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER WITH THE INTRODUCTION OF A COMPLEX OF BERBERINE WITH β -CYCLODEXTRIN IN CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION IN RATS

*Belonovskaya E.B., Naruta E.E., Lukivskaya O.Ya., Moroz V.L.,
Kuzmitskaya I.A., Eroshenko Yu.V., Kirko S.N., Buko V.U.*

*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds,
NAS of Belarus, Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The hepatoprotective properties of berberine and its supramolecular complex with 2-HP- β -CD were studied in the model of alcoholic steatohepatitis in rats. It was shown that compared to the single drug, the complexed form of berberine had a more pronounced lipid-lowering activity, reducing the degree of steatosis, and also had an anti-inflammatory effect, contributing to a significant decrease in signs of inflammation of the liver parenchyma and the level of the key pro-inflammatory cytokine TNF- α .*

УЧАСТИЕ ОЗОНА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

*Билецкая Е.С.¹, Зинчук В.В.¹, Муравьев А.В.², Гуляй И.Э.¹,
Богданович Е.Р.¹, Трусова И.С.¹*

¹ Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Республика Беларусь;

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет имени К.Д. Ушинского» г. Ярославль, Российская Федерация

Резюме. Исследовали эффект озона на показатели кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантного баланса в условиях действия веществ, изменяющих активность газотрансмиттеров (монооксида азота, сероводорода), а также при обработке дезоксигенирующей газовой смесью в опытах *in vitro*. Установлено, что инкубация крови с озоном и нитроглицерином приводит к усилению эффекта данного фактора на кислородсвязывающие свойства крови.

Введение. Озон (O₃) активно применяется как в клинической, так и профилактической медицине, относится к группе методов окислительной терапии [7]. Данный газ улучшает кровообращение и доставку кислорода в ишемизированные ткани, увеличивает уровень 2,3-дифосфоглицерата, усиливает общий обмен веществ за счет улучшения доставки кислорода, обеспечивает хорошее самочувствие у большинства пациентов, вероятно, посредством нейроэндокринной стимуляции, активизирует нейропротекторные системы [4]. Благодаря высокой реактогенной способности O₃ активно вступает в реакции с различными биологическими объектами, в том числе с мембранными структурами клетки, которые выступают в роли основной мишени его физиологического действия. Однако эффект данного газа на систему крови изучен недостаточно. Цель данного исследования — оценить участие озона в регуляции функционирования системы крови.

Материалы и методы исследования. Опыты *in vitro* выполнялись на образцах крови, взятой от белых крыс-самцов массой 250–300 г, предварительно содержавшихся в стандартных условиях вивария. Под адекватным наркозом (50 мг/кг тиопентала натрия интраперитонеально) проводили забор смешанной венозной крови из правого предсердия в объеме 8 мл в предварительно подготовленный шприц с гепарином из расчета 50 ЕД на 1 мл крови. Исследование выполнялось в соответствии с рекомендациями комитета по биомедицинской этике и деонтологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол № 1 от 14 января 2019 г.).

Проведено две серии экспериментов. В первой — образцы крови были разделены на 6 экспериментальных групп: контрольная (1-я) и опытные (2–6). В опытные группы к 3 мл крови добавляли 1 мл озонированного изотонического раствора хлорида натрия (в 1-ю — без озонирования) и 0,1 мл растворов, содержащих препараты, изменяющие активность L-аргинин-NO системы (во 2-ю группу — изотонический раствор хлорида натрия); в 3-ю — нитроглицерин в конечной концентрации 0,2 ммоль (SchwarzPharma AG); в 4-ю — L-аргинин 3 ммоль

(Sigma-Aldrich); в 5-ю — N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester 1,25 ммоль (L-NAME, Sigma-Aldrich); в 6-ю — комбинацию L-NAME и L-аргинин, после чего пробы перемешивали.

Во второй серии образцы крови были разделены на 6 аликвот по 3 мл. В группах 2, 4, 5, 6 осуществляли дезоксигенацию крови в термостатируемом сатураторе газовой смесью (5,5 % CO₂; 94,5 % N₂) на протяжении 30 мин. К аликвотам добавляли озонированный изотонический раствор хлорида натрия в объеме 1 мл (в контроль и 2-ю без озонирования) и 0,1 мл растворов, содержащих газотрансмиттеры (в 5-ю — нитроглицерин в конечной концентрации 0,2 ммоль (SchwarzPharma AG), в 6-ю — гидросульфид натрия в конечной концентрации 0,38 ммоль (Sigma-Aldrich)), в остальные группы — изотонический раствор хлорида натрия, после чего пробы перемешивали.

Время инкубации двух серий составило 60 мин. Изотонический раствор хлорида натрия барбатировался озono-кислородной смесью, создаваемой озонотерапевтической установкой УОТА-60-01-Медозон (Россия), в которой осуществлялся контроль концентрации озона.

После добавления озона на газоанализаторе Stat Profile pHox plus L в крови при +37 °C определяли следующие показатели кислородтранспортной функции и кислотно-основного состояния: парциальное давление кислорода (pO₂), степень оксигенации (SO₂), парциальное давление углекислого газа (pCO₂), стандартный бикарбонат (SBC), реальный/стандартный недостаток (избыток) буферных оснований (ABE/SBE), гидрокарбонат (HCO₃⁻), концентрация водородных ионов (pH), общая углекислота плазмы крови (TCO₂). Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) оценивали спектрофотометрическим методом по показателю p50_{реал} (pO₂ крови при 50 % насыщении ее кислородом). По формулам Severinghaus [8] рассчитывали значение p50_{станд} и положение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО). Затем кровь центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин, отбирали плазму, а эритроциты трижды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия.

Содержание малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах определяли по взаимодействию с 2'-тиобарбитуровой кислотой с максимумом поглощения при длине волны 535 нм [3]. Уровень диеновых конъюгатов (ДК) фиксировали по интенсивности поглощения липидным экстрактом монохроматического светового потока в области спектра 232–234 нм [3]. Активность каталазы в гемолизатах измеряли по методу М. Королюк [5]. Концентрацию α -токоферола и ретинола регистрировали по методу S.L. Taylor [9]. Продукцию эндогенного монооксида азота (NO) оценивали по суммарному содержанию нитрат/нитритов (NO₃⁻/NO₂⁻) в плазме крови спектрофотометрическим методом с реактивом Грисса при длине волны 540 нм [6]. Уровень эндогенного сероводорода (H₂S) в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом, основанном на реакции между сульфид-анионом и раствором N,N-диметил-парафенилендиамина солянокислого [10]. Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого были использованы методы непараметрической статистики с применением программы «Statistica 10.0».

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при инкубации крови с озоном наблюдается рост pO₂ и SO₂, а также установлено уменьшение сродства гемоглобина к кислороду и увеличение содержания ДК, МДА и активности каталазы в эритроцитарной массе в двух сериях по сравнению с контролем.

В ходе выполнения первой серии эксперимента было выявлено, что введение нитроглицерина приводит к усилению эффекта озона на кислородтранспортную функцию крови. При этом отмечается увеличение pO₂, SO₂, показателя p50_{реал} и соответственно большая степень сдвига КДО вправо по сравнению с группой, получавшей только O₃. При добавлении L-аргинина,

L-NAME и их комбинации изменения данных параметров, а также кислотно-основного состояния крови не наблюдается. Также в условиях коррекции L-аргинин-NO системы (нитроглицерин, L-аргинин, L-NAME) показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса существенно не изменяются.

Суммарное содержание $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови под действием O_3 возрастает. При добавлении нитроглицерина в этих условиях концентрация $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ существенно увеличивается по сравнению с группой, в которую вводили только озон. Уровень газотрансмиттера H_2S под действием данного газа возрастает. При добавлении нитроглицерина или L-аргинина этот показатель также повышается по сравнению с группой, в которую вводили только озон. Добавление L-NAME или его комбинации с L-аргинином не приводит к увеличению содержания данных газотрансмиттеров. Известно, что взаимодействие NO и H_2S может влиять на модификацию СГК через образование различных дериватов гемоглобина, модулирование внутриэритроцитарной системы формирования кислородсвязывающих свойств крови, а также, опосредованно, через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина [1]. Результаты нашего исследования показывают, что нитроглицерин как непосредственный донор NO усиливает эффект O_3 на кислородтранспортную функцию крови. NO наряду с pH и 2,3-дифосфоглицератом может быть модулятором кислородсвязывающих свойств гемоглобина и изменять СГК через NO-зависимые внутриэритроцитарные механизмы [1]. Рост газотрансмиттеров, отмечаемый в наших опытах, вносит вклад в изменение кислородтранспортной функции крови. Озон уменьшает СГК, реализуя свое действие через участие NO и H_2S (повышение концентрации нитрат/нитритов и сероводорода). Участие L-аргинин-NO системы в изменении кислородсвязывающих свойств крови при действии озона подтверждается результатами наших исследований, в которых показано уменьшение СГК при введении нитроглицерина.

Гемоглобин, циркулируя по кровеносному руслу подвергается действию как низких значений pO_2 (например, в тканях), так и достаточно высоких в легочных капиллярах [2]. Во второй серии экспериментов нами установлено, что система газотрансмиттеров участвует в эффекте озона на кислородтранспортную функцию крови в условиях дезоксигенации, которая приводит к снижению pO_2 и SO_2 в сравнении с контролем. Показатель сродства гемоглобина к кислороду $\text{p50}_{\text{реал}}$ также уменьшается. Схожая динамика изменений отмечается и по $\text{p50}_{\text{станд}}$. Наблюдается сдвиг реакции крови в сторону ацидоза, что подтверждается снижением значения pH и ростом концентрации pCO_2 , SBC, ABE/SBE, HCO_3^- , TCO_2 . Добавление озона в дезоксигенированную кровь приводит к росту pO_2 , SO_2 , $\text{p50}_{\text{реал}}$ и $\text{p50}_{\text{станд}}$, однако в сравнении с 3-й группой (озонирование без дезоксигенации) отмечается их снижение. Введение нитроглицерина усиливает эффект данного газа на кислородтранспортную функцию и на параметры кислотно-основного состояния в заданных условиях. При добавлении гидросульфида натрия наблюдается снижение pO_2 , SO_2 и увеличение $\text{p50}_{\text{реал}}$ и $\text{p50}_{\text{станд}}$ в сравнении с 3-й группой. Результаты выполненного нами исследования демонстрируют, что озон в условиях дезоксигенации и коррекции системы газотрансмиттеров способен участвовать в процессах формирования кислородсвязывающих свойств крови. Нитроглицерин и гидросульфид натрия как непосредственные доноры монооксида азота и сероводорода усиливают влияние озона на показатели сродства гемоглобина к кислороду.

Заключение. Таким образом, физиологическое действие O_3 на кислородсвязывающие свойства крови реализуется при участии газотрансмиттеров (монооксида азота и сероводорода). Предполагается, что данный газ может участвовать в трансформации действия биологически активных веществ природного происхождения на кислородтранспортную функцию крови и усиливается введением нитроглицерина.

Список литературы

1. Донець, Д.Г. Озонотерапія в клініці внутрішніх хвороб / Д.Г. Донець // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2009. — Т. 9, № 2. — С. 9–10.
2. Зинчук, В.В. NO-зависимые механизмы внутриэритроцитарной регуляции сродства гемоглобина к кислороду / В.В. Зинчук, Т.Л. Степура; под ред. В.В. Зинчука. — Гродно : ГрГМУ, 2016. — 175 с.
3. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В.С. Камышников. — Изд. 2-е. — Минск: Беларусь, 2002. — Т. 2. — 463 с.
4. Курильчик, А.В. Озонотерапия в современной клинической практике / А.В. Курильчик, Е.В. Смирнова, В.И. Бульда // Практикующий лікар. — 2016. — Т. 5, № 3. — С. 92–94.
5. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаборатор. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–19.
6. Bryan, N.S. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples / N.S. Bryan, M.B. Grisham // Free Radic. Biol. Med. — 2007. — Vol. 43, № 5. — P. 645–657.
7. Prophylactic ozone administration reduces intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia — reperfusion in the rat [Electronic resource] / O. Onal [et al.] // Mediators Inflamm. — 2015. — Vol. 2015 — Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/792016>. — Date of access: 25.05.2020.
8. Saveringhaus, J.W. Blood gas calculator / J.W. Saveringhaus // J. Applied Physiol. — 1966. — Vol. 21, № 5. — P. 1108–1116.
9. Taylor, S.L. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis / S.L. Taylor, M.P. Lamden, A.L. Tappel // Lipids. — 1976. — Vol. 11, № 7. — P. 530–538.
10. The liver as central regulator of hydrogen sulfide / E.J. Norris [et al.] // Shock. — 2011. — Vol. 36, № 3. — P. 242–250.

PARTICIPATION OF OZONE IN REGULATION OF BLOOD SYSTEM FUNCTIONING

Biletskaya E.¹, Zinchuk V.¹, Muravyov A.², Gulyai I.¹, Bogdanovich E.¹, Trusava I.¹

¹*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

²*Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D.Ushinsky, Yaroslavl, Russia*

Summary. *The effect of ozone on the oxygen transport function and prooxidant-antioxidant balance was studied under the action of substances that change the activities of gaseous transmitters (nitrogen monoxide, hydrogen sulfide), as well as when treated with a deoxygenated gas mixture in vitro. It was established that the incubation of blood with ozone and nitroglycerin leads to an increase in the effect of this factor on the oxygen-binding properties of blood.*

НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОРЕ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КОМПЛЕКСНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ МОРФИНОМ И ЭТАНОЛОМ

Величко И.М., Лелевич С.В., Лелевич В.В.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Наркомания, осложненная алкоголизмом, является актуальной проблемой как Республики Беларусь, так и ряда зарубежных стран. Экспериментальное моделирование хронической комплексной интоксикации морфином и этанолом на протяжении 7, 14 и 21 дня позволило продемонстрировать изменения концентрации биогенных аминов и нейроактивных аминокислот в коре больших полушарий головного мозга крыс. Данные нарушения в большей степени наблюдались при совместном поэтапном введении психоактивных веществ на протяжении 7 суток и сопровождались снижением содержания показателей дофаминергической системы и нейромедиаторных аминокислот, а также процессами ускорения оборота серотонина. Тогда как 21-дневная комплексная интоксикация привела к накоплению предшественников серотонина и тормозных аминокислот (ГАМК и глицина).

Введение. Совместное потребление алкоголя и опиоидов является серьезной и нарастающей проблемой населения. По мнению ряда авторов, сочетанное употребление разных наркотиков (полинаркомания), а также наркотиков и алкоголя (осложненная наркомания) значительно изменяет клинику заболеваний, приводит к более тяжелым медицинским и социальным последствиям [2, 3, 6].

В ряде работ обсуждены механизмы совместного действия алкоголя и опиоидов, где приводятся данные об изменении толерантности к респираторным депрессантным эффектам морфина у экспериментальных животных [12], морфологических изменениях головного мозга умерших людей [1], изменения состава биологических жидкостей умерших людей [10]. Авторами отмечается проблема установления причины наступления смерти при комплексном отравлении алкоголем и опиоидами [10]. Также имеются случаи употребления алкоголя среди лиц с хронической болью, которые используют опиоиды для снятия боли [14]. Таким образом, данная проблема достаточно актуальна среди населения.

Длительное воздействие этанола или морфина связано с изменениями уровней нейротрансмиттеров в нескольких центральных областях мозга [4, 5, 7, 8, 9, 11, 13]. Обособленное хроническое потребление алкоголя и морфина приводит к функциональным и морфологическим изменениям практически всех органов и систем организма. Так, значительные изменения наблюдаются в функциях нервной, сердечно-сосудистой, эндокринной и иммунной систем. Происходит нарушение функции печени, имеются значительные изменения в белковом, липидном и углеводном обмене [5]. Имеются сведения о влиянии алкоголя и морфина на функционирование катехоламиновых, серотониновых нейромедиаторов причастности данных систем к основным патогенетическим синдромам алкоголизма: мотивации, толерантности и физической зависимости [9, 11]. Таким образом, при длительном потреблении алкоголя и морфина развивается особый комплекс психических и соматических патологи-

ческих изменений [4, 5, 9]. Однако все эти данные получены в изолированных экспериментальных моделях алкогольной и морфиновой интоксикации, которые не позволяют исследовать комплекс метаболических и нейрохимических нарушений при совместном введении психоактивных веществ. В доступной нам литературе не обнаружено данных, которые были бы посвящены биохимическому анализу изменений в головном мозге при взаимном влиянии алкоголя и опиоидов, что может приводить к изменению содержания нейротрансмиттеров в различных отделах головного мозга.

Материалы и методы исследования. Эксперименты были выполнены на 70 беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, находящихся на стандартном рационе вивария при свободном доступе к воде. Все опыты проводились с учетом «Правил и норм гуманного обращения с биологическими объектами исследований». Морфина гидрохлорид в виде 1%-го раствора вводили однократно внутрибрюшинно, при первом введении — в дозе 5 мг/кг и при последующих — 10 мг/кг массы тела, а 25%-й раствор этанола — внутривенно в дозе 3,5 г/кг. Были сформированы следующие экспериментальные группы: 1-я — контроль; 2-я — 7-дневная хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ 7); 3-я — 7-дневная комплексная интоксикация этанолом и через 12 ч — морфином (ХАИ+ХМИ 7); 4-я — 14-дневная хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ 14); 5-я — 14-дневная комплексная интоксикация этанолом и через 12 ч — морфином (ХАИ+ХМИ 14); 6-я — 21-дневная хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ 21); 7-я — 21-дневная комплексная интоксикация этанолом и через 12 ч — морфином (ХАИ+ХМИ 21). Животные, которым вводился этанол (ХАИ 7, ХАИ 14, ХАИ 21) сначала внутрибрюшинно вводили эквивалентное количество физ. раствора и через 12 ч — этанол. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество 0,9%-го раствора NaCl. Декапитация осуществлялась через 1 ч после последнего введения растворов. После этого на холоде отбирали вентральную область коры больших полушарий, которую замораживали в жидком азоте. Образцы тканей (20–80 мг) взвешивали и гомогенизировали в 10 объемах 0,2 МНСlO₄, содержащей ванилиновую кислоту (VA, 10 мкМ), а также 50 мг/л ЭДТА и 50 мг/л Na₂S₂O₅ в качестве антиоксиданта, после чего центрифугировали при +4°C 15 мин, 16000g, супернатант немедленно отделяли от осадка.

Уровни биогенных аминов, их предшественников и метаболитов (тирозин (Тир), диоксифенилаланин (ДОФА), дофамин (ДА), 3,4-доиксифенилуксусная кислота (ДОФУК), гомованилиновая кислота (ГВК), норадреналин (НА), триптофан (Трп), 5-окситриптофан, серотонин, 5-оксиндолуксусная кислота (5-ОИУК)) и нейроактивных аминокислот (ГАМК, глицин, аспарат и глутамат) в коре больших полушарий определяли методом ион-парной ВЭЖХ и детектированием по флуорисценции. При определениях нейромедиаторных аминокислот использовался хроматограф Agilent 1200 с 4-канальной системой подачи растворителя, термостатируемым автосамплером, термостатом колонок, детектором флуоресценции. Хроматограммы обрабатывали с помощью программы AgilentChemStation.

Поскольку распределение значений показателей в группах соответствовало закону нормального распределения (согласно W-критерию Шапиро-Уилка, сравнению медиан и средних, построению графиков), при сравнении использовались параметрические методы статистики. Обработка данных осуществлялась с помощью пакета программ Statistica 10,0 (SN: AXAR207F394425FA-Q). Попарное сравнение групп проводилось с использованием критерия Т-Стьюдента, достоверная значимость при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При проведении 7-дневной алкогольной интоксикации (ХАИ 7) была выявлена тенденция к снижению содержания дофамина и серото-

нина, а содержание нейрoактивных аминокислот сильно не изменилось в сравнении с контролем. В свою очередь, 7-дневная комплексная интоксикация морфином и последующим этанолом (ХМИ+ХАИ 7) сопровождалась статистически значимым ростом тирозина на 49 %, триптофана — на 33 %, 5-окситриптофана — на 17 % и снижением концентрации ДОФА на 64 %, ГВК — на 29 %, глицина — на 15 %, глутамата — на 13 %, аспартата — на 15 % в сравнении с контролем. Был выявлен достоверно значимый рост концентрации тирозина, триптофана, серотонина (на 36 %, 20 %, 17 % соответственно) и снижение ГВК, ГАМК, глицина, глутамата (на 60 %, 29 %, 16 %, 16 %, 11 % соответственно) в сравнении с ХАИ 7. Из вышеприведенных данных видно, что 7-дневная алкогольная интоксикация приводит к уменьшению концентрации дофамина, серотонина. При комплексной интоксикации (ХМИ+ХАИ 7) было выявлено уменьшение дофамина и продуктов его метаболизма — ГВК и ДОФА, что может свидетельствовать о снижении синаптического выброса и оборота нейромедиатора. Касательно серотонинергической системы, комплексная 7-дневная интоксикация (ХМИ+ХАИ 7) сопровождалась ростом концентрации нейромедиатора и его предшественников (тирозина, 5-окситриптофана), что является признаком ускорения оборота серотонина, чего не происходило при действии алкоголя. Это может быть ответом на сниженное содержание дофамина. ХАИ 7 не приводит к изменению концентрации нейрoактивных аминокислот, а при комплексной 7-дневной интоксикации (ХМИ+ХАИ 7) происходило их снижение.

Увеличение срока алкоголизации (ХАИ 14) сопровождается статистически значимым снижением содержания триптофана на 26 %, увеличением глицина на 14 % в сравнении. Отмечена тенденция снижения содержания дофамина в сравнении с контролем. Сниженная концентрация дофамина на фоне неизменного содержания продуктов его метаболизма может свидетельствовать о его расходовании и нарушении процессов синтеза при двухнедельной алкоголизации, а показатели серотонинергической системы и нейрoактивных аминокислот при ХАИ 14 близки к контрольным значениям. Хроническая комплексная 14-дневная интоксикация (ХМИ+ХАИ 14) привела к достоверно значимому повышению тирозина, триптофана, глицина и глутамата (на 38 %, 22 %, 26 %, 6 %, соответственно) в сравнении с контрольной группой. При ХМИ+ХАИ 14 наблюдалось достоверно значимое повышение концентрации триптофана, 5-окситриптофана и ГАМК (на 38 %, 39 %, 12 % соответственно), чем при ХАИ 14. Двухнедельная алкогольная и комплексная интоксикация приводит к нормализации показателей дофаминергической и серотонинергической систем, что может быть связано с адаптационными процессами.

Проведение алкоголизации на протяжении 21 дня (ХАИ 21) в коре больших полушарий не привело к изменению концентраций серотонина, дофамина и нейрoактивных аминокислот. В данной группе снизилась концентрация предшественника серотонина — 5-окситриптофана на 32 % в сравнении с контрольными значениями. В свою очередь, комплексная интоксикация (ХМИ+ХАИ 21) привела к достоверно значимому превышению контрольных значений концентрации тирозина, триптофана, 5-окситриптофана, ГАМК и глицина (на 79 %, 50 %, 21 %, 19 % и 26 % соответственно). В группе ХМИ+ХАИ 21 выявлено статистически значимое увеличение концентрации тирозина, триптофана, 5-окситриптофана, 5-ОИУК, ГАМК, глицина и аспартата (на 56 %, 69 %, 78 %, 25 %, 22 %, 23 % и 11 % соответственно), чем при ХАИ 21. Увеличение сроков комплексной интоксикации до 21 дня привело к ускорению оборота серотонина и было отражено накоплением продуктов его метаболизма (триптофана, 5-окситриптофана, 5-ОИУК), а также повышению содержания тормозных аминокислот (ГАМК и глицина), чего не наблюдалось при 21-дневной алкоголизации.

Заключение. 1. Комплексное введение морфина и этанола на протяжении 7 дней сопровождалось снижением показателей дофаминергической системы и нейроактивных аминокислот, а также ускорением оборота серотонина.

2. Двухнедельная комплексная интоксикация привела к нормализации показателей дофаминергической и серотонинергической систем и росту содержания глицина и глутамата.

3. Введение морфина и последующего этанола на протяжении 21 дня привело к ускорению оборота серотонина и повышению концентрации тормозных аминокислот (ГАМК и глицина).

Список литературы

1. Беловицкий, О.В. Субмикроскопическая морфология головного мозга при алкогольно-морфинной интоксикации в эксперименте / О.В. Беловицкий // Таврический медико-биологический вестник. — 2010. — Т. 13, № 1. (49) — С. 13–16.

2. Благов, Л.Н. Опиоидная зависимость, осложненная алкоголизмом: клинико-психопатологические особенности и проблемы диагностики / Л.Н. Благов, Д.И. Кургак // Международный медицинский журнал. — 2005. — № 2. — С. 41–47.

3. Гиленко, М.В. Органические психические расстройства, осложненные зависимостью от алкоголя / М.В. Гиленко // Наркология. — 2015. — № 4. — С. 56–62.

4. Лелевич, С.В. Особенности нейромедиации в головном мозге крыс при хронической алкогольной интоксикации / С.В. Лелевич, В.В. Лелевич, Е.М. Дорошенко // Вопросы наркологии. 2010. — № 3. — С. 56–66.

5. Лелевич, С.В. Центральные и периферические метаболические механизмы хронической алкогольной интоксикации / С. В. Лелевич, Е. В. Барковский // Наркология. — 2013. — № 7. — С. 50–56.

6. Маскаленко, В.Д. Социальные последствия алкоголизма и наркомании / В.Д. Маскаленко // Наркология. — 2007. — № 3. — С. 25–29.

7. Пивоварчик, М.В. Участие опиоидной и дофаминовой систем мозга в реализации аддиктивных свойств этанола / М.В. Пивоварчик // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2003. — № 4. — С. 3–6.

8. Хроническая морфиновая интоксикация и обмен нейроактивных аминокислот в головном мозге белых крыс / А.Г. Винницкая [и др.] // Биомедицинская химия. — 2005. — Т. 51, № 3. — С. 295–302.

9. Центральные нейрхимические эффекты острого и хронического воздействия этанола. Механизмы толерантности и зависимости (обзор литературы) / В.Б. Долго-Сабуров [и др.] // Токсикология. — 2011. — Т. 12. — С. 1423–1436.

10. Шигеев, С.В. Алкоголь-фактор риска смертельного отравления опиатами / С.В. Шигеев, Ю.М. Жук // Проблемы экспертизы в медицине. — 2005. — Т. 5, № 19. — С. 30–33.

11. Drugs of Abuse Specifically Sensitize Noradrenergic and Serotonergic Neurons Via a Non-Dopaminergic Mechanism / Ch. Lanteri [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2008. — Vol. 33. — P. 1724–1734.

12. Morphometrical analysis of the effect of morphine administration on brain's prefrontal region in male rat / C. Jalili [et al.] // Int. J. Morphol. — 2014. — V. 32. — P. 761–766.

13. Regional Brain Metabolism During Alcohol Intoxication / D. Nora Volkow [et al.] // Alcoholism. — 2000. — Vol. 24, № 6. — P. 822–829.

14. The Interaction of Alcohol Use and Cannabis Use Problems in Relation to Opioid Misuse Among Adults with Chronic Pain / Andreev H. Rogers [et al.] // Int. J. of Behavioral Medicine. — 2019. — Vol. 26. — P. 569–575.

NEUROTRANSMITTER CHANGES IN CEREBRAL CORTEX OF RATS WITH CHRONIC COMBINED MORPHINE AND ETHANOL INTOXICATION

Velichko I.M., Lelevich S.V., Lelevich V.V.

*Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. Drug addiction complicated by alcoholism is an important problem of the Republic of Belarus and of a number of foreign countries. Experimental modeling of chronic combined intoxication with morphine and ethanol for 7, 14, and 21 days allowed us to demonstrate changes in the concentration of biogenic amines and neuroactive amino acids in the cerebral cortex of rats. These disorders were observed to a greater degree with the combined intoxication of psychoactive substances over a period of 7 days and were accompanied by a decrease in the content indicators of dopaminergic system and neurotransmitter amino acids, as well as processes of accelerating the turnover of serotonin, whereas 21-day combined intoxication led to accumulation of precursors of serotonin and inhibitory amino acids (GABA and glycine).

РОЛЬ ЙОДСОДЕРЖАЩИХ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ФОРМИРОВАНИИ ГОРМОНАЛЬНОГО ОТВЕТА НА СТРЕСС У ДЕСИМПАТИЗИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ

Гусакова Е.А., Городецкая И.В.

*Учреждение образования «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский университет»,
г. Витебск, Республика Беларусь*

Резюме. В опытах на 54 беспородных крысах-самцах (220–240 г) получены новые данные о функциональной взаимосвязи симпатoadренальной и тиреоидной осей при стрессе: введение гуанетидина (30 мг/кг внутривнутрибрюшинно 28 суток) приводит к существенному, в 1,81 раза, возрастанию К/И-коэффициента и потенцирует его подъем при стрессе «дефицита времени» (до 2,96 против 1,76 в группе «Стресс»). Введение малых доз L-тироксина (1,5–3,0 мкг/кг внутривнутрижелудочно 28 суток) ограничивает рост К/И-коэффициента при десимпатизации (до 1,45) и последующем стрессе (до 1,91).

Введение. Установлено значение нарушения метаболических процессов, вызываемого воздействием экстремальных раздражителей, в возникновении и развитии заболеваний человека неинфекционной этиологии [10]. Доказана роль симпатoadренальной системы в инициации реакций общего адаптационного синдрома [11]. Важное значение в реализации последних принадлежит кортикостероидам и инсулину, соотношение уровней которых (К/И-коэффициент) отражает напряженность компенсаторных механизмов [5]. Значительно меньше известно о вкладе в этот процесс йодсодержащих гормонов щитовидной железы. Также остается неизученной функциональная связь между указанными эндокринными осями в условиях стресса.

Цель настоящего исследования — установить влияние малых доз L-тироксина на вызванное десимпатизацией изменение напряженности общего адаптационного синдрома при эмоциональном стрессе.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 54 беспородных половозрелых крысах-самцах массой 220–240 г. При проведении экспериментов соблюдались требования гуманного обращения с экспериментальными животными, содержащиеся в методических указаниях «Положение о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе учреждения образования “Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет” и мерах по реализации требований биомедицинской этики» (2010).

Животные были разделены на следующие группы: «Интakтные», «Контроль», «Стресс», «Тироксин», «Тироксин+стресс», «Десимпатизация», «Десимпатизация+стресс», «Тироксин+десимпатизация», «Тироксин+десимпатизация+стресс».

Стресс моделировали воспроизведением ситуации «дефицита времени» [3]. Для этого крыс помещали в нижнюю часть широкого спиралевидно-закрученного шланга по одной особи, после чего его отверстие закрывали. Узкую трубку, находящуюся в середине широкого шланга на всем его протяжении, подсоединяли к крану с холодной (+4 °C) водой, которая после включения быстро заполняла устройство снизу. Постоянство скорости подачи воды контролировали

положением вентиля крана. Экспериментальное животное, стараясь избежать контакта с водой, вынуждено было перемещаться вверх по ходу спирали. Состояние стресса формировалось за счет того, что крыса должна быстро двигаться вверх и никак не может повлиять своими действиями на ситуацию, в которой оказалась. После того, как животное достигало верхнего отверстия шланга, его помещали в индивидуальную клетку. Затем пробку внизу широкого шланга открывали и выпускали воду. Вследствие этого по окончании тестирования каждого животного установка промывалась большим количеством воды. Это обеспечивало полное удаление продуктов жизнедеятельности крыс. Индивидуальное исследование животных исключало влияние на их физиологические реакции присутствия другой особи.

Крыс декапитировали через час после стресса под уретановым наркозом (1 г/кг внутривенно).

L-тироксин в малых дозах вводили внутривенно в 1%-м крахмальном клейстере в возрастающих дозах (1-я неделя — 1,5 мкг/кг; 2-я неделя — 2 мкг/кг; 3-я неделя — 2,5 мкг/кг; 4-я неделя — 3 мкг/кг). С целью исключения влияния на параметры стресс-реакции самой процедуры введения контрольным животным, как и подвергнутым стрессу без введения препаратов, также вводили клейстер аналогичным способом.

Функциональную десимпатизацию вызывали внутривенным введением гуанетидина (30 мг/кг, 4 недели). Крысам группы «Гуанетидин» на протяжении всего периода параллельно вводили 1%-й крахмальный клейстер.

Для исследования влияния близких к физиологическим доз L-тироксина на изменения, вызванные функциональной десимпатизацией, животным вводили L-тироксин и гуанетидин, описанными выше способами.

Крыс групп «Тироксин», «Десимпатизация», «Тироксин+десимпатизация» забивали на следующий день после окончания введения соответствующих препаратов. Животных групп «Тироксин+стресс», «Десимпатизация+стресс», «Тироксин+десимпатизация+стресс» подвергали стрессу на следующий день после введения препаратов.

Для определения уровня кортикостероидов и инсулина в сыворотке крови использовали иммуноферментный метод. Применяли наборы реактивов «ДС-ИФА-Стероид-Кортизол» (НПО Диагностические системы, Россия) и «InsulinTestSystem» (MonobindInc. Accu-Bind, California USA). Оптическую плотность измеряли на фотометре универсальном Ф 300 ТП (Беларусь). Соотношение уровней кортикостероидов и инсулина — К/И-коэффициент, отражающий, как указано выше, напряженность компенсаторных механизмов, в группе «Контроль» принимали за 1,0.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с применением пакета прикладных программ «STATISTICA 10.0» (StatSoft inc., STA999K347156-W), Microsoft EXCEL (Microsoft inc.) на персональной ЭВМ с использованием модулей «Основные статистики и таблицы», «Непараметрические статистики». Количественные параметры представляли в виде Me (LQ; UQ), где Me — медиана, (LQ; UQ) — интерквартильный интервал: верхняя граница нижнего квартиля (LQ) и нижняя граница верхнего квартиля (UQ). Поскольку изучаемые группы являлись независимыми, для анализа различий по количественному параметру при межгрупповом сравнении использовали U-критерий Манна-Уитни для попарного сравнения групп. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез был принят $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. У интактных животных концентрация кортикостероидов в крови составила 22,77 (18,14; 25,19) нмоль/л, инсулина — 1,32 (1,16; 1,48) мкМЕ/мл.

У контрольных крыс данные показатели статистически не отличались и были равны: содержание кортикостероидов 21,37 (19,18; 24,26) нмоль/л, инсулина — 1,30 (1,19; 1,44) мкМЕ/мл.

Воздействие ситуации «дефицита времени» привело к возрастанию содержания кортикостероидов в крови на 43 % ($p < 0,01$). Сывороточная концентрация инсулина при этом, напротив, падала на 19 % ($p < 0,01$). Вероятно, это связано с ингибированием его секреции β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы под влиянием катехоламинов [7], вырабатываемых в повышенных количествах при стрессе [8]. Вследствие указанных изменений уровня кортикостероидов и инсулина в крови их соотношение — К/И-коэффициент — значительно возрос (в 1,76 раза).

Введение L-тироксина в избранных нами дозах не изменяло содержание кортикостероидов и инсулина в крови, как и значение К/И-коэффициента.

При стрессе у животных, получавших L-тироксин, уровень кортикостероидов повышался менее значительно чем у крыс, перенесших стресс после получения L-тироксина лишь на 19 % ($p < 0,01$ по сравнению с группой «Тироксин»). Содержание инсулина снижалось также менее существенно — только на 9 % ($p < 0,01$ по отношению к группе «Тироксин»), что, вероятно, связано с ограничением L-тироксина выброса адреналина в этих условиях и уменьшением возможности реализации ингибирующего эффекта этого гормона на функцию β -инсулоцитов. Вследствие описанных сдвигов уровня кортикостероидов и инсулина в крови величина К/И-коэффициента возросла по сравнению с группой «Тироксин» всего в 1,38 раза.

Вследствие указанных изменений по отношению к ее значению у контрольных животных концентрация кортикостероидов в крови была выше на 21 % ($p < 0,01$), уровень инсулина ниже на 11 % ($p < 0,05$). Величина К/И-коэффициента была больше в 1,37 раза.

По сравнению с их значением у подвергнутых стрессу крыс, не получавших L-тироксин, сывороточный уровень кортикостероидов был ниже на 22 % ($p < 0,01$), инсулина — больше на 8 % ($p < 0,01$), поэтому величина К/И-коэффициента была меньше в 1,28 раза.

Введение симпатолитика гуанетидина увеличило концентрацию кортикостероидов в крови на 55 % ($p < 0,01$) и, напротив, снизило уровень инсулина на 14 % ($p < 0,05$), что, вероятно, связано с показанным другими авторами [9] уменьшением экспрессии гена инсулина в островках поджелудочной железы у животных, подвергнутых химической десимпатизации с помощью 6-гидроксидопамина (60 мг/кг). У крыс группы «Гуанетидин» значение К/И-коэффициента значительно возросло — в 1,81 раза.

У десимпатизированных животных, подвергнутых стрессу, содержание кортикостероидов в крови повышалось, как и при стрессе у крыс, не получавших гуанетидин, однако более существенно: по отношению к группе «Десимпатизация» — на 52 % ($p < 0,01$). Сывороточная концентрация инсулина снижалась практически в такой же степени, как в группе «Стресс» — на 16 % ($p < 0,01$). В результате величина К/И-коэффициента увеличивалась в 1,64 раза.

По отношению к его значению у контрольных животных уровень кортикостероидов в крови был выше на 107 % ($p < 0,01$), концентрация инсулина ниже на 30 %, поэтому значение К/И-коэффициента было существенно больше — в 2,96 раза.

По сравнению с аналогичными показателям у крыс группы «Стресс» содержание кортикостероидов в крови было выше на 64 % ($p < 0,01$), инсулина — ниже на 11 % ($p < 0,01$). Вследствие этого величина К/И-коэффициента была больше в 1,68 раза.

У десимпатизированных животных, получавших малые, близкие к физиологическим, дозы L-тироксина, сывороточный уровень кортикостероидов был выше, чем в группе «Тироксин», на 38 % ($p < 0,05$), концентрация инсулина — такой же ($p > 0,05$). Значение К/И-коэффициента было больше в 1,46 раза.

По отношению к его величине в группе «Десимпатизация» содержание кортикостероидов в крови имело тенденцию к снижению ($0,05 < p < 0,1$), инсулина было выше на 8 % ($p < 0,01$). Значение К/И-коэффициента, напротив, было ниже — в 1,25 раза.

По сравнению с его величиной в группе «Контроль» уровень кортикостероидов был больше на 36 % ($p < 0,05$), а инсулина — таким же ($p > 0,05$). Величина К/И-коэффициента была выше в 1,45 раза.

У десимпатизированных крыс, получавших L-тироксин и подвергнутых стрессу, концентрация кортикостероидов в крови возрастала, как после стресса у симпатэктомированных животных, которым не вводили L-тироксин, но менее значительно: по отношению к группе «Тироксин+десимпатизация» — на 28 % ($p < 0,05$). Сывороточное содержание инсулина уменьшалось также менее существенно — только на 8 % ($p < 0,05$). Следовательно, значение К/И-коэффициента повышалось всего в 1,32 раза, что свидетельствует о снижении напряжения компенсаторных процессов при стрессе у десимпатизированных крыс под влиянием L-тироксина.

Вследствие описанных изменений по отношению к группе «Контроль» уровень кортикостероидов в крови был больше на 64 % ($p < 0,01$), инсулина — ниже на 14 % ($p < 0,05$). Величина К/И-коэффициента была выше в 1,91 раза.

По сравнению с группами «Тироксин+стресс» и «Стресс» концентрация кортикостероидов была выше на 43 % ($p < 0,01$) и 21 % ($p < 0,05$), содержание инсулина было таким же ($p > 0,05$). Значение К/И-коэффициента было выше в 1,62 и 1,39 раза.

По отношению к группе «Десимпатизация+стресс» сывороточный уровень кортикостероидов был меньше на 43 % ($p < 0,05$), инсулина, напротив, больше на 16 % ($p < 0,05$). Значение К/И-коэффициента было ниже в 1,55 раза.

Заключение. Дефицит симпатических влияний, возникающий в результате введения гуанетидина, вызывает увеличение концентрации кортикостероидов и падение содержания инсулина в крови, что отражает значительное напряжение компенсаторных механизмов, судя по существенному (в 1,81 раза), возрастанию К/И-коэффициента, и определяет его наиболее высокое значение в условиях стресса (у животных группы «Десимпатизация+стресс» его величина составила 2,96, тогда как у крыс группы «Стресс» — 1,76; по отношению к значению указанного параметра в группе «Десимпатизация» увеличение составило 1,64 раза). Это способствует падению устойчивости организма к стрессу, что подтверждается данными, полученными другими исследователями [1, 4, 6].

Введение близких к физиологическим доз L-тироксина ограничивает подъем уровня кортикостероидов и предупреждает снижение содержания инсулина в крови, а следовательно, минимизирует повышение К/И-коэффициента при десимпатизации само по себе (величина указанного параметра в группе «Тироксин+десимпатизация» была равна 1,45) и существенно лимитирует возрастание К/И-коэффициента при стрессе у крыс, получавших гуанетидин (его значение в группе «Тироксин+ десимпатизация+стресс» было равно 1,91; по сравнению с величиной К/И-коэффициента в группе «Тироксин+десимпатизация» повышение составило 1,24 раза). Следовательно, в настоящем исследовании представлены результаты, указывающие на ограничение малыми дозами L-тироксина напряженности компенсаторных механизмов при эмоциональном стрессе не только у животных с интактной симпатической нервной системой, что было продемонстрировано нами ранее и при стрессе «свободного плавания в клетке» [2], но и у симпатэктомированных крыс. Полученные новые данные свидетельствуют о функциональной взаимосвязи симптоадреналовой и тиреоидной осей в отношении гормональной регуляции реакций общего адаптационного синдрома при стрессе.

Список литературы

1. Белякова, Е.И. Изменение содержания серотонина в различных отделах мозга крыс при однократном и пролонгированном ноцицептивном воздействии / Е.И. Белякова // Успехи современного естествознания. — 2007. — № 7. — С. 109–110.
2. Городецкая, И.В. Влияние йодсодержащих тиреоидных гормонов на систему протеолиза при стрессе / И.В. Городецкая, Е.А. Гусакова // Вестник СГМА. — 2013. — Т. 12, № 3. — С. 18–28.
3. Гусакова, Е.А. Способ моделирования эмоционального стресса «дефицита времени» / Е.А. Гусакова, И.В. Городецкая // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2019. — Т. 105, № 4. — Р. 520–530.
4. Родионов, И.М. Иммунологическая и химическая десимпатизация / И.М. Родионов, В.Н. Ярыгин, А.А. Мухаммедов. — М: Наука, 1988. — 149 с.
5. Панин, Л.Е. Биохимические механизмы стресса / Л.Е. Панин. — Новосибирск : Наука, 1983. — 233 с.
6. Basalandrenocorticotropin-stimulated corticosterone in the neonatal rat exposed to hypoxia from birth: modulation by chemical sympathectomy / H. Raff [et al.] // Endocrinol. — 2004. — Vol. 145, № 1. — P. 79–86.
7. Glucose metabolism and catecholamines / E. Barth [at al.] // Crit. Care Med. — 2007. — Vol. 35, № 9. — P. 508–518.
8. Ivabradine reduces baseline and stress-induced increase of heart rate and blood pressure and modulates neuroendocrine stress response in rats depending on stressor intensity / K. Ondicova [et al.] // Gen. Physiol. Biophys. — 2019. — Vol. 38, № 2. — P. 165–173.
9. Kvist-Reimer, M. Effects of chemical sympathectomy by means of 6-hydroxydopamine on insulin secretion and islet morphology in alloxan-diabetic mice / M. Kvist-Reimer, F. Sundler, A. Bo // Cell Tissue Res. — 2002. — Vol. 307, № 2. — P. 203–209.
10. Stress-induced metabolic disorder in peripheral Cd4+ T cells leads to anxiety-like behavior / K.Q. Fan [et al.] // Cell. — 2019. — Vol. 179, № 4. — P. 864–879.
11. Sympathoadrenal system in stress / R. Kvetňanský [et al.] // Annals New York Academy of Sciences. — 2006. — Vol. 771. — P. 131–158.

ROLE OF IODINE-CONTAINING THYROID HORMONES IN THE FORMATION OF HORMONAL RESPONSE TO STRESS IN SYMPATHECTOMIZED ANIMALS

Gusakova E.A., Gorodetskaya I.V.

Vitebsk State Order of People's Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Summary. *In experiments on 54 outbred male rats (220–240 g) new data about the functional relationships of sympathoadrenal and thyroid systems in stress were obtained: injection of guanethidine (30 mg/kg intraperitoneally for 28 days) led to a significant increase in the corticosteroid/insulin coefficient (by 1.81 times) and potentiated its rise in stress of «time deficiency» (up to 2.96 against 1.76 in the group «Stress»). The injections of small doses of L-thyroxine (1.5–3.0 µg/kg intragastrically for 28 days) limited the growth of corticosteroid/insulin coefficient in desympatization (up to 1.45) and subsequent stress (up to 1.91).*

ПОКАЗАТЕЛИ ФОНДА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ КРОВООБРАЩЕНИЯ

Дорошенко Е.М.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Исследовали состояние пула свободных аминокислот в структурах ЦНС крыс через 13 недель после экспериментального сужения брюшной аорты. Пул свободных аминокислот имел тенденцию к обеднению без явного превалирования «возбуждающих» и «тормозных» медиаторов. Наиболее выраженные сдвиги отмечались в пуле серосодержащих аминокислот: снижение уровня таурина, вероятно, обусловленное замедлением транссульфурирования, что сопровождалось снижением уровня триптофана.

Введение. Среди биохимических сдвигов у пациентов с заболеваниями сердца и сосудов обращает на себя внимание частота нарушений обмена свободных аминокислот, в том числе имеющих отношение к синтезу биологически активных соединений, участвующих в регуляции ритма и проводимости, сократительной функции [1, 2]. Метаболические расстройства, связанные с фондом (пулом) аминокислот, играют значимую роль в развитии хронической сердечной недостаточности, а также при ИБС, где они могут приводить к нарушениям ритма сердца, включая фатальные [1, 3]. Поражения ЦНС при сердечно-сосудистой патологии (артериальной гипертензии, хронической сердечной недостаточности) могут сопровождаться дисбалансом уровней свободных аминокислот, в том числе аминокислот-трансммиттеров, в структурах головного мозга. Делались попытки установить взаимосвязи между показателями аминокислотного фонда биологических жидкостей (плазмы, СМЖ) и мозга.

Внутри пула свободных аминокислот существуют многочисленные связи метаболического и регуляторного характера. Среди компонентов аминокислотного пула особая роль принадлежит серосодержащим аминокислотам, реакции превращения которых сопряжены с обменом других аминокислот, синтезом ряда гормонов, медиаторов, глутатиона, а конечный продукт их превращений — таурин — является нейромедиатором/модулятором в ЦНС. Его содержание весьма высокое в сердце. В экспериментальных условиях и в клинике было установлено, что в патогенезе заболеваний, в том числе заболевания сердца и сосудов [4], может играть роль недостаточность триптофана (по механизму прекурсорного контроля в синтезе медиаторов), а также таурина [5], являющегося для человека относительно незаменимым соединением. Так как формирование пула Тау зависит от активности реакций, использующих пиридоксальфосфат, широкий круг патологических состояний может отражаться на формировании пула Тау. Следовательно, характеристика пула соединений, участвующих в формировании пула Тау должна включать оценку уровней и его непосредственных предшественников (СА, CSA и НрТау).

Цель работы — определить метаболические соотношения компонентов пула свободных аминокислот в головном мозге крыс при экспериментальной недостаточности кровообращения.

Материалы и методы исследования. Экспериментальную недостаточность кровообращения у крыс моделировали с помощью искусственного сужения просвета брюшной аорты выше места отхождения почечных артерий путем наложения металлической спирали, ограничивающей просвет аорты до 1 или 0,7 мм [6,7 в собственной модификации]. Операции выполняли под кетаминовой анестезией (100 мг/кг, внутримышечно). В эксперименте использовано 40 белых крыс-самцов гетерогенной популяции, массой тела в начале эксперимента 130–200 г, находившихся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде, которые адаптировались до операции в течение 14–19 суток. Животным одной из групп была выполнена операция, не включавшая этап наложения спирали на аорту. Данная группа использована в качестве ложнооперированного контроля. После выполнения операции животных содержали на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде в течение 12 недель. Данная модель воспроизводит недостаточность кровообращения по гемодинамическим показателям [6] и соответствуют наблюдающейся при артериальной гипертензии и аортальном стенозе (изометрическая гиперфункция сердца, вызывающая гипертрофию сердечной мышцы). Нами была выбрана стабильная фаза длительной компенсации, которая наблюдается у животных после 1–2 месяцев после операции. За это время в результате роста крыс степень сужения просвета брюшной аорты прогрессирует, достигая 2,5–3-кратного.

Животных забивали декапитацией. Образцы тканей головного мозга (отделы головного мозга — часть лобной доли больших полушарий, ствол мозга, стриатум, гипоталамус) забирали в течение 3 мин после забоя животных [8] и немедленно замораживали в жидком азоте.

Образцы тканей гомогенизировали в микропробирках Эппендорфа объемом 1,6 мл специально пригнанным тефлоновым пестиком в соотношении 1:10 (по объему) в среде, содержащей 0,2 М раствор хлорной кислоты, 40 мг/л ЭДТА, 40 мг/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, а также 0,2 мМ норвалина (внутренний стандарт). Далее образцы центрифугировали при +4 °С в течение 15 мин при 16000g, супернатанты немедленно отбирали аспирацией и хранили до исследования при –18 °С. Растворы стандартов, использованные для калибровки, обрабатывали аналогичным способом.

Определение свободных аминокислот и их дериватов проводили методом обращенно-фазной хроматографии с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции (338/445 нм) [9].

Колонка Zorbax Eclipse Plus C_{18} с размером частиц 3,5 мкм, 2,1 × 150 мм, с предколоночкой 2,1 × 12,5 мм с таким же сорбентом, размером частиц 5 мкм. Подвижная фаза: 4-компонентная Na-ацетатная буферная система, включающая: 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 4,85, содержащий 20 мг/л ЭДТА (А); ацетонитрил/вода 7/3 (об/об) (В), метанол/вода 7/3 (об/об) (С), 0,1 М раствор ацетата натрия, содержащий 20 мг/л ЭДТА (D). Растворы А и D содержали по 40 мг/л азида натрия. Градиентное элюирование от 3,5 до 100 % В, с изменением соотношения В/С и А/D в ходе анализа, за 69,5 мин (полный цикл до начала дериватизации следующей пробы — 81,5 мин); температура колонки +35 °С.

Порядок элюирования определяемых соединений: цистеиновая кислота (CA), О-фосфосерин (PSer), цистеинсульфиновая кислота (CSA), аспарагиновая кислота (Asp), гомоцистеиновая кислота (HCA), глутаминовая кислота (Glu), аспарагин (Asn), серин (Ser), α -аминоадипиновая кислота (α AAA), глутамин (Gln), гистидин (His), глицин (Gly), 3-метилгистидин (3MHis), фосфоэтанолламин (PEA), треонин (Thr), 1-метилгистидин (1MHis), цитруллин (Citr), аргинин (Arg), β -аланин (β Ala), аланин (Ala), таурин (Tau), β -аминоизомасляная кислота (β ABA), γ -аминомасляная кислота (GABA), тирозин (Tyr), α -аминомасляная кислота (α ABA), этаноламин (EA), валин (Val), метионин (Met), цистатионин (Ctn), норвалин (nVal) — внутренний стандарт, триптофан (Trp),

фенилаланин (Phe), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), орнитин (Orn), лизин (Lys). Использовался прибор ВЭЖХ Agilent 1200. Реактивы для приготовления подвижных фаз были квалификации не ниже хч. При пробоподготовке использовалась центрифуга Biofuge Primo R+ с охлаждаемым ротором (Thermo Scientific, США). Прием данных и обработка хроматограмм проводились с помощью пакета Agilent OpenLab CDS C.01.05 с ручной коррекцией базовой линии.

Для исследуемых показателей определяли базовые параметры описательной статистики. Отклонение распределения значений от нормального оценивали критериями Колмогорова–Смирнова. Значения в группах сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок с учетом сравнения дисперсий. Для проверки достоверности парных сравнений использовали медианный тест Манна-Уитни. Для оценки достоверности изменений при сравнении трех и более групп применяли тест Краскелла-Уоллиса. Для выявления значимости вклада отдельных показателей в комплексную характеристику пула свободных аминокислот и родственных соединений в группах, а также выявления наиболее информативных показателей использовали пошаговый дискриминантный анализ, для оценки достоверности дискриминации групп использовали величину лямбда Уилкса. Используемые методы анализа данных реализованы с помощью пакета программ Statistica 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q).

Результаты исследования и их обсуждение. Через 13 недель после операции у животных, которым сужали просвет брюшной аорты до величины 1 мм, относительная масса сердца (Mc/мт) достоверно не повышалась. В этой группе у 3 животных наблюдалось развитие аневризм брюшной аорты, т. е. механизм развития сердечной недостаточности был смешанным (изометрическая + изотоническая гиперфункция), развитие выраженной гипертрофии миокарда при котором менее вероятно. Если накладываемая спираль имела диаметр 0,7 мм, то по истечении 13 недель после операции развивалась выраженная гипертрофия сердца (рост относительной массы сердца на 35 %, $p < 0,0001$) и ни у одного животного не развились аневризмы аорты, что говорит о воспроизведении изометрической перегрузки сердца.

После наложения спирали внутренним диаметром 0,7 мм в больших полушариях снижались уровни аспартата, глутамата (табл. 1), а также гипотаурина и таурина. После наложения спирали диаметром 1 мм наблюдалось снижение также уровней глицина и ГАМК. Таким образом, баланс «возбуждающих» и «тормозных» аминокислот-трансммиттеров сохранялся. Снижение синтеза таурина может быть обусловлено торможением реакций превращений серосодержащих аминокислот, начиная со второй реакции транссульфурирования (это подтверждается существенным ростом уровня цистатинина по отношению к ложноперирированным животным) и до образования гипотаурина.

Пул исследованных показателей показал высокую дискриминацию групп, если из анализа исключали уровни карнозина и ансерина (лямбда Уилкса 0,00185, $p < 0,0001$). Корень 1 дискриминантной функции, по которому различались опыт и контроль, коррелировал с уровнями цистатинина и таурина и описывал 81,8 % полной дисперсии; корень 2, по которому различались опытные группы между собой, коррелировал с уровнями тирозина, аланина и гипотаурина; при этом оба корня описывали 94,3 % полной дисперсии. Наиболее информативными показателями (по величинам F-констант), влияющими на дискриминацию, были уровни цистатинина, тирозина и аланина (рис. 1) Следовательно, наиболее выраженные изменения имеют место в пуле серосодержащих аминокислот и характеризуются снижением скорости превращений серосодержащих аминокислот и синтеза таурина, вероятно, на уровне реакции, катализируемой цистатининлиазой.

В стволе мозга только после наложения спирали с просветом 0,7 мм снижались уровни аспартата, глутамата, а также таурина и гипотаурина, уровни цистатионина в обеих опытных группах были повышены по отношению к интактному контролю, хотя и в меньшей степени, чем в больших полушариях (табл. 1) Кроме того, у животных обеих опытных групп снижался уровень ГАМК. Следует отметить, что уровень метионина в группе с сужением просвета аорты до 0,7 мм был ниже, чем у интактного, но не ложнооперированного контроля, хотя уровень таурина был снижен и по отношению к ложнооперированному контролю. Следовательно, сдвиги в обмене серосодержащих аминокислот не объясняются только доступностью предшественника.

Следует отметить, что в стволе, как и в больших полушариях, уровень триптофана снижался одновременно с уровнями таурина и гипотаурина, однако в стволе между уровнем триптофана, с одной стороны, и уровнями таурина и гипотаурина, с другой, имелись положительные корреляции ($r = 0,71$ и $0,81$ соответственно, $p < 0,05$).

Таблица 1 — Содержание свободных аминокислот и родственных соединений в структурах мозга крыс через 12 недель после искусственного сужения просвета брюшной аорты

Показатель	Интактный контроль, n = 8	ЛО контроль, n = 8	Сужение аорты до 1 мм, n = 7	Сужение аорты до 0,7 мм, n = 8
Большие полушария				
Asp	2148,79 ± 113,99	1950,06 ± 50,339	1886,71 ± 140,17	1718 ± 62,3 ^{*,**}
Glu	9830,66 ± 433,76	8690,73 ± 332,47	8951,79 ± 695,05	8259,8 ± 332,0 [*]
Gly	1220,11 ± 60,31	1040,38 ± 78,53	870,83 ± 65,376 [*]	1012,81 ± 94,314
HpTau	139,127 ± 13,893	128,946 ± 22,145	108,676 ± 8,0756	76,104 ± 14,151 [*]
Tau	6134,81 ± 356,27	5225,27 ± 178,91	4299 ± 222 ^{*,**}	5051,3 ± 316,58 [*]
GABA	2474,81 ± 102,79	2292,81 ± 106,16	1940 ± 101 ^{*,**}	2243,71 ± 218,84
Ctn	21,810 ± 1,8596	18,908 ± 1,8923	47,45 ± 4,05 ^{*,**}	60,497 ± 9,257 ^{**}
Trp	48,48 ± 1,30	46,96 ± 3,01	36,37 ± 1,74 ^{*,**}	43,77 ± 1,53 [*]
Ствол				
Asp	1417,47 ± 79,61	1396,01 ± 50,578	1246,73 ± 83,104	1077 ± 87,6 ^{*,**}
Glu	4430,88 ± 205,08	4374,98 ± 216,46	3987,00 ± 255,88	3468 ± 267 ^{*,**}
HpTau	28,091 ± 3,6845	39,733 ± 8,0400	35,434 ± 15,815	16,91 ± 3,00 ^{*,**}
Tau	1546,13 ± 100,41	1736,80 ± 138,89	1380,57 ± 172,79	1272,1 ± 93,32 ^{**}
GABA	4248,49 ± 236,85	4085,61 ± 320,56	3201 ± 210 ^{*,**}	3226,0 ± 353,58 [*]
Met	24,414 ± 1,0053	23,984 ± 2,1718	21,638 ± 1,3810	18,463 ± 1,6551 [*]
Ctn	32,552 ± 5,7888	49,236 ± 7,2833	53,994 ± 7,8912 [*]	62,001 ± 10,861 [*]
Trp	43,07 ± 1,40	45,32 ± 1,87	34,76 ± 1,38 ^{*,**}	36,72 ± 2,94 ^{**}
Гипоталамус				
Asp	1617,49 ± 51,40	1450,92 ± 76,694	1040 ± 34,4 ^{*,**}	1532,21 ± 37,19
Glu	6861,24 ± 250,30	5998,5 ± 253,43 [*]	3898 ± 341,9 ^{*,**}	6581,84 ± 249,49
Gly	2610,09 ± 80,690	2028,86 ± 74,72 [*]	2813,3 ± 341,7 ^{**}	2234 ± 53,7 ^{*,**}
HpTau	129,00 ± 12,36	148,147 ± 18,508	36,3 ± 12,01 ^{*,**}	122,26 ± 14,681
Tau	4308,22 ± 251,67	3227,8 ± 167,5 [*]	2290,6 ± 458,0 [*]	3833,5 ± 162,4 ^{**}
GABA	9174,6 ± 413,45	7287,2 ± 253,3 [*]	3224 ± 391 ^{*,**}	8280 ± 282,6 ^{**}
Стриатум				
Asp	1076,42 ± 73,93	1089,78 ± 82,57	998,424 ± 42,229	875,1 ± 41,3 ^{*,**}
Glu	7486,3 ± 387,82	7215,8 ± 342,18	6220 ± 231 ^{*,**}	6067 ± 286,7 ^{*,**}
HpTau	127,25 ± 9,337	80,14 ± 19,043 [*]	58,440 ± 9,1844 [*]	65,497 ± 11,816 [*]
Tau	7789,4 ± 482,27	7329,9 ± 311,02	5182 ± 249 ^{*,**}	5578 ± 299,0 ^{*,**}

Показатель	Интактный контроль, n = 8	ЛО контроль, n = 8	Сужение аорты до 1 мм, n = 7	Сужение аорты до 0,7 мм, n = 8
GABA	2757,9 ± 197,49	2874,6 ± 109,07	2204 ± 157,2**	2098 ± 156,6***
Trp	51,02 ± 1,54	52,41 ± 2,78	41,02 ± 2,21***	43,01 ± 2,36***

Примечание: нмоль/г ткани; среднее ± средняя ошибка среднего; * p < 0,05 по отношению к интактному контролю; ** p < 0,05 по отношению к ложнопериоперированному контролю.

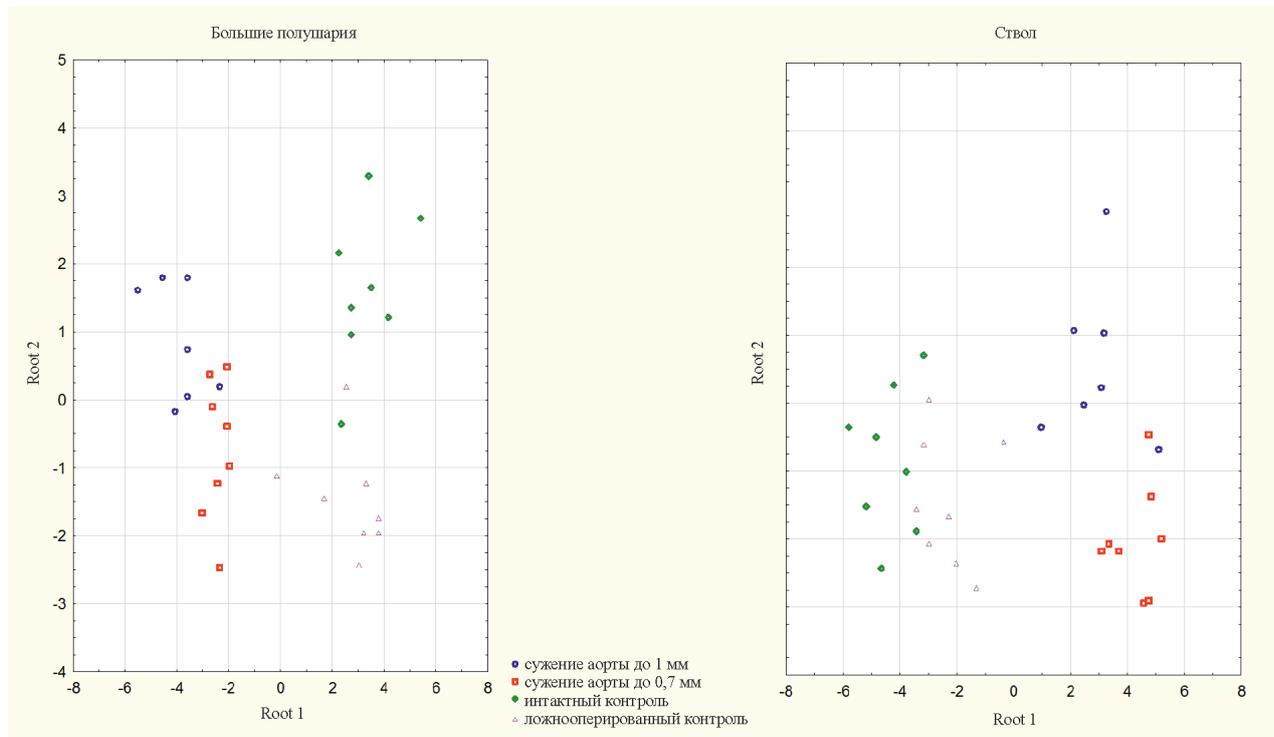


Рисунок 1 — Расположение отдельных реализаций экспериментальных групп на плоскости корней дискриминантных функций (Root 1 и Root 2)

При дискриминантном анализе видно, что обе опытные группы отчетливо дискриминируются от контрольных групп (см. рис. 1). Наиболее высокие значения F-констант были у уровней триптофана, гистидина и 3-метилгистидина, орнитина и фосфосерина. Различия опытных и ложнопериоперированной групп заметны по корню 2, наибольшее влияние на значение которого оказывали уровни триптофана и 3-метилгистидина. Оба корня суммарно описывают 87,7 % полной дисперсии. Очевидно, недостаточность триптофана в этом отделе мозга является наиболее выраженным изменением в пуле свободных аминокислот.

В гипоталамусе крыс недостаточность таурина зарегистрирована только после сужения аорты до 1 мм (см. табл. 1). В этой же группе снижались также уровни аспартата, глутамата, глутамината и ГАМК. При сужении просвета аорты до 0,7 мм наблюдалось, напротив, повышение уровня тормозных транснамиттеров глицина, ГАМК и таурина по отношению к ложнопериоперированному контролю.

Уровни возбуждающих аминокислот-транснамиттеров в стриатуме в обеих опытных группах снижались (см. табл. 1). Одновременно снижались уровни таурина, ГАМК и в меньшей степени — гипотаурина, метионина. Имеет место общее обеднение аминокислотного пула, включающее уровни всех медиаторных аминокислот, а также серусодержащих соединений.

Таким образом, недостаточность синтеза таурина при НК во всех исследованных структурах мозга сопровождалась также снижением уровня триптофана, а в стволе мозга эти показатели коррелировали друг с другом, что может указывать на наличие взаимосвязи недостаточности триптофана и нарушений обмена серосодержащих аминокислот.

Заключение. 1. Недостаточность кровообращения, вызываемая сужением просвета брюшной аорты, сопровождается однонаправленными сдвигами содержания аминокислот-трансммиттеров и других компонентов пула свободных аминокислот в больших полушариях, стволе и стриатуме крыс, включающих тенденцию к обеднению пула без явного превалирования «возбуждающих» и «тормозных» медиаторов.

2. Наиболее выраженные сдвиги в аминокислотном пуле больших полушарий, ствола и стриатума при экспериментальной недостаточности кровообращения отмечаются в пуле серосодержащих аминокислот. Они выражаются в снижении уровня таурина, вероятно, обусловленном замедлением цистатионинлиазной реакции. Тауриновый дефицит при экспериментальной недостаточности кровообращения наблюдался в структурах головного мозга и экспериментальных группах, где отмечалось снижение уровня триптофана.

3. Сдвиги в обмене серосодержащих аминокислот в исследованных отделах головного мозга при экспериментальной недостаточности кровообращения не опосредованы изменениями уровня метионина.

Список литературы

1. Дорошенко, Е.М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности / Е.М. Дорошенко, В.А. Снежицкий, В.В. Лелевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2017. — Т. 15, № 5. — С. 551–556.

2. Коган, А.Х. Новая простая методика сужения почечных и других артерий у мелких лабораторных животных в хроническом эксперименте / А.Х. Коган // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1961. — № 1. — С. 112–115.

3. Непомнящих, Л.М. Морфометрия и стереология гипертрофии сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Т.И. Непомнящих. — Новосибирск : Наука, 1986. — 303 с.

4. Снежицкий, В.А. Аритмии у пациентов с хронической сердечной недостаточностью: клинические и биохимические особенности: монография / В.А. Снежицкий, Н.С. Белюк, Е.В. Зуховицкая ; под ред. В.А. Снежицкого. — Гродно : ГрГМУ, 2014. — 215 с.

5. Смирнов, В.Ю. Фонд свободных аминокислот и их производных при избыточном поступлении таурина и его функциональной недостаточности : Автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / В.Ю. Смирнов ; Ин-т питания РАМН. — М., 1998. — 21 с.

6. Glowinsky, J. Regional studies of catecholamines in the rat brain. The disposition of [3H]-norepinephrine, [3H]-dopamine and [3H]-DOPA in various regions of the brain / J. Glowinsky, L. L. Iversen // J. Neurochem. — 1966. — Vol. 13, № 8. — P. 655–669.

7. L-tryptophan-kynurenine pathway metabolites regulate type I IFNs of acute viral myocarditis in mice / M. Hoshi [et al.] // J. Immun. — 2012. — Vol. 188, № 8. — P. 3980–3987.

8. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans / S. Cheng [et al.] // Circulation. — 2012. — Vol. 125, № 18. — P. 2222–2231.

9. Tryptophan depletion affects heart rate variability and impulsivity in remitted depressed patients with a history of suicidal ideation / L. Booij [et al.] // Biol. Psychiatry. — 2006. — Vol. 60, № 5. — P. 507–514.

COMPONENTS OF THE POOL OF FREE AMINO ACIDS AND THEIR DERIVATIVES IN THE BRAIN OF RATS UNDER EXPERIMENTAL CIRCULATORY INSUFFICIENCY

Doroshenko Ye.M.

*Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The pool of free amino acids was studied in brain structures of rats after 13 weeks following artificial narrowing of the abdominal aorta. The pool of free amino acids tended to be depleted without obvious prevalence of either excitatory or inhibitory transmitters. The most profound shifts were observed in the pool of sulfur-containing amino acids: the decrease of taurine level which was likely to be due to the inhibition of transsulfuration. This was accompanied by a reduction of the level of tryptophan.*

ТКАНЕВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФОНДА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ У ИНТАКТНЫХ КРЫС

Дорошенко Е.М., Зулпиев С.Н.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Исследовали содержание компонентов пула свободных аминокислот и родственных соединений в тканях интактных крыс. Установлено, что пулы свободных аминокислот тканей и плазмы крови интактных животных относительно независимы друг от друга. Уровень гомоцистеина в плазме крови в норме не имеет устойчивых взаимосвязей с уровнями других серосодержащих соединений в тканях. В норме синтез кинуреновой кислоты мышцами не лимитируется доступностью кинуренина.

Введение. Остается невыясненным целый ряд метаболических предпосылок развития и прогрессирования патологии сердца и сосудов. Даже для показателей с известной диагностической информативностью часто нет достаточных данных, позволяющих говорить о механизмах и источниках (ткани) изменений. Для решения этой задачи необходимы данные о тканевых пулах свободных аминокислот, включая ткань сердечной мышцы. До настоящего времени не получили удовлетворительного описания взаимосвязи между пулами аминокислот сердца, печени, с одной стороны, и плазмы крови — с другой. Такие взаимосвязи могут как реализовываться на уровне систем транспорта или общих метаболических путей, так и быть обусловленными прямым участием компонентов пула, пополняемых в одной ткани, в метаболизме других (межорганный метаболизм). Известна роль нарушений превращений серосодержащих аминокислот в генезе ишемических поражений при заболеваниях сердца, в том числе гипергомоцистеинемии [2].

Ранее нами было показано, что у пациентов с ИБС наблюдается развитие метаболического дисбаланса, включающего как метаболизм триптофана, так и превращения серосодержащих аминокислот [1]. Были получены результаты, свидетельствующие о перспективности аминокислотного анализа для характеристики метаболического гомеостаза при заболеваниях внутренних органов [3]. Имеется ряд работ, обосновывающих центральную роль нарушений обмена свободных аминокислот при алкогольной интоксикации и зависимости [4], поражениях печени [5], иммунодефицитных состояниях [6]. Тем не менее, не получила исчерпывающей характеристики картина взаимосвязи аминокислотного пула периферических тканей с характеристикой метаболизма миокарда и аминокислотным пулом плазмы крови.

Цель работы — определить метаболические соотношения компонентов пула свободных аминокислот и родственных соединений в плазме крови и тканях лабораторных животных в норме.

Материалы и методы исследования. Для оценки соотношений компонентов пула свободных аминокислот и родственных соединений в плазме крови и тканях крыс в норме использовали 10 белых крыс беспородной популяции, содержащихся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. Животных забивали декапитацией. За 12 ч до забоя живот-

ных лишали пищи. После забоя собирали кровь в гепаринизированные пробирки. Образцы тканей (печень, сердце, скелетная мышца) забирали в течение 3 мин после забоя животных и немедленно замораживали в жидком азоте.

Незамедлительно после забора крови осаждали форменные элементы центрифугированием при 3000 г в течение 15 мин, отделяли плазму крови аспирацией. Образцы плазмы помещали в две отдельные пробирки. Один образец использовали для определения метаболитов триптофана и свободных аминокислот; образец №2 — для анализа аминотиолов, включая общий гомоцистеин. Время от момента отделения плазмы до замораживания или начала пробоподготовки — не более 15 мин во избежание завышения в пробах содержания глутамата, а также влияния распада глутамина.

В образцах плазмы крови осаждали белки 1 М раствором хлорной кислоты, содержащей норвалин (nVal, внутренний стандарт), и центрифугировали на холоду. Образцы тканей гомогенизировали в среде, содержащей 0,2 М раствор хлорной кислоты и nVal. Растворы стандартов, использованные для калибровки хроматографического оборудования, обрабатывали аналогичным способом.

Определение свободных аминокислот и их дериватов проводили в хлорнокислых экстрактах тканей и плазмы крови методом обращенно-фазной хроматографией с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции (338/445 нм) [7]. В данной системе последовательно элюируются следующие соединения: цистеиновая кислота (CA), О-фосфосерин (PSer), цистеинсульфиновая кислота (CSA), аспарагиновая кислота (Asp), гомоцистеиновая кислота (HCA), глутаминовая кислота (Glu), аспарагин (Asn), серин (Ser), α -аминоадипиновая кислота (α AAA), глутамин (Gln), гистидин (His), глицин (Gly), 3-метилгистидин (3MHis), фосфоэтанолламин (PEA), треонин (Thr), 1-метилгистидин (1MHis), цитруллин (Citr), аргинин (Arg), β -аланин (β Ala), аланин (Ala), таурин (Tau), β -аминоизомасляная кислота (β ABA), γ -аминомасляная кислота (GABA), тирозин (Tyr), α -аминомасляная кислота (α ABA), этаноламин (EA), валин (Val), метионин (Met), цистатионин (Ctn), норвалин (nVal) — внутренний стандарт, триптофан (Trp), фенилаланин (Phe), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), орнитин (Orn), лизин (Lys). Для определения пролина, оксипролина и саркозина проводили дополнительную дериватизацию проб с флуоренилметилхлороформатом (FMOC).

Хроматограмма свободных аминокислот в ткани сердца приведена на рис. 1. Разрешающая способность метода для исследуемых тканей практически совпадала с таковой для плазмы крови.

Мощные антиоксидантные эффекты карнозина и информативность ансерина как маркера повреждения мышечной ткани (в том числе при ишемии) [8] делают их одним из предполагаемых индикаторов гипоксического повреждения тканей.

Для определения ключевых метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана использовали обращенно-фазную ВЭЖХ с изократическим элюированием и комбинированным детектированием по поглощению (362 нм) и флуоресценции (244/386 нм). Использовали колонку Zorbax Eclipse Plus C₁₈, 3,5 мкм, 2,1 × 150 мм, которую термостатировали при +40 °С. Подвижная фаза: 0,65 г ацетата натрия, 15 мкл CH₃COOH, 550 мг безводного ацетата цинка на 250 мл H₂O, 4 об % ацетонитрила. На рис. 2 приведена хроматограмма стандартов кинуренина и кинуреновой кислоты в мышцах. Уровень кинуренина во всех исследованных тканях сопоставим с таковым в плазме крови, а уровень кинуреновой кислоты убывает в ряду мышцы–печень–сердце.

Гомоцистеин и другие аминотиолы (цистеин — Cys, цистеинилглицин — CysGly, гамма-глутамилцистеин — γ GluCys) глутатион — GSH) определяли ВЭЖХ с предколоночной дерив-

ватизацией тиолов, восстановленных трис-(карбоксиэтил) фосфином с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом (SBD-F) с последующим разделением полученных производных методом обращенно-фазной ВЭЖХ [9] с градиентным элюированием [10]. В качестве внутреннего стандарта использовали N-ацетилцистеин (NAC).

Хроматограмма плазмы крови крысы показана на рис. 3.

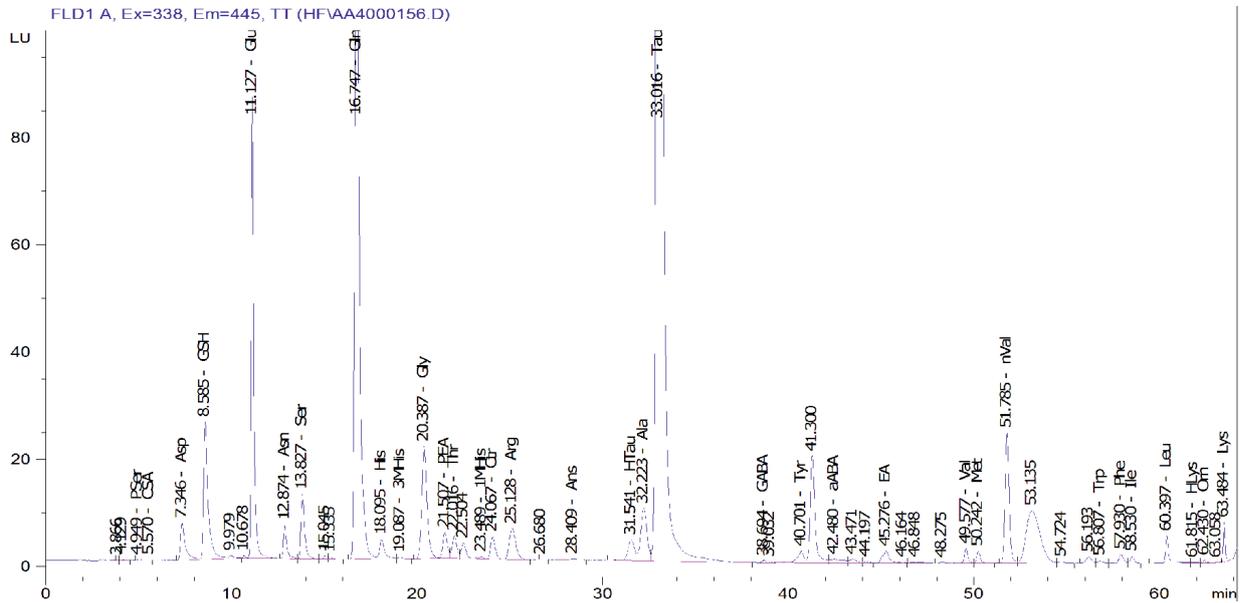


Рисунок 1 — Хроматограмма свободных аминокислот и их производных хлорнокислого экстракта ткани сердца крысы

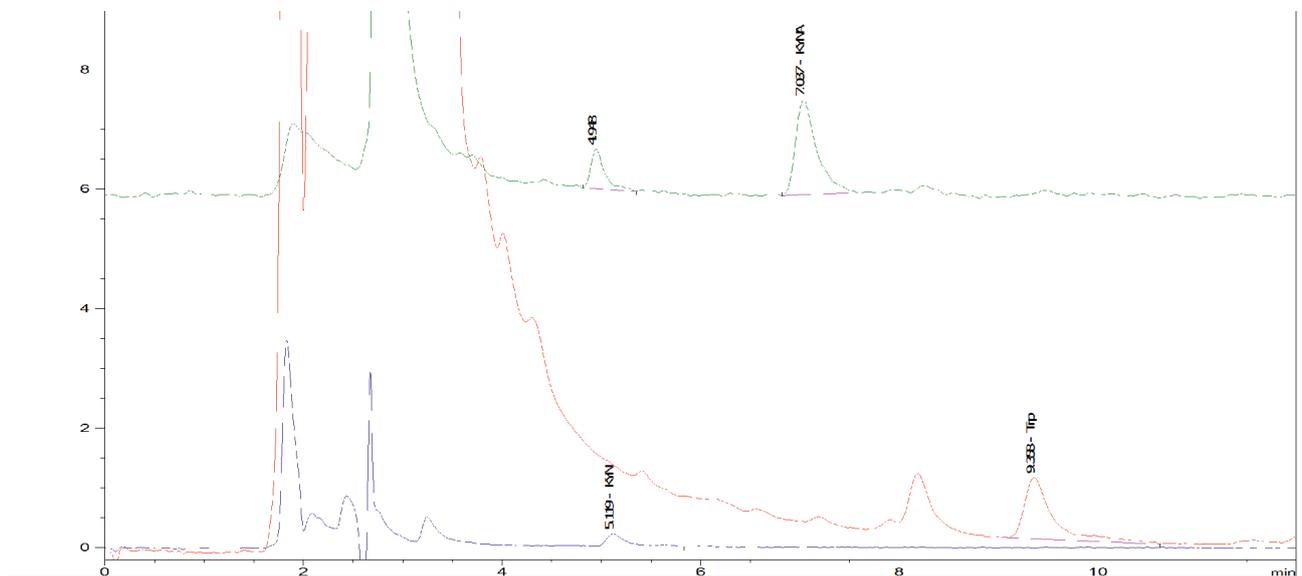


Рисунок 2 — Типичная хроматограмма хлорнокислого экстракта мышц крысы

При определениях использовался прибор ВЭЖХ Agilent 1200, реактивы квалификации не ниже хч, стандарты соединений Aldrich, центрифуга Biofuge Primo R+ с охлаждаемым ротором (Thermo Scientific, США). Прием данных и обработка хроматограмм проводились с помощью программы Agilent OpenLab CDS C.01.05 с ручной коррекцией базовой линии, расчет по внутреннему стандарту (определение кинуренина — по внешнему стандарту).

Для исследуемых показателей определяли базовые параметры описательной статистики. Для всех показателей группа считалась однородной. Корреляционные связи между определенными переменными в пределах групп определяли путем построения корреляционных матриц Пирсона. Используемые методы анализа данных реализованы с помощью пакета программ Statistica 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q).

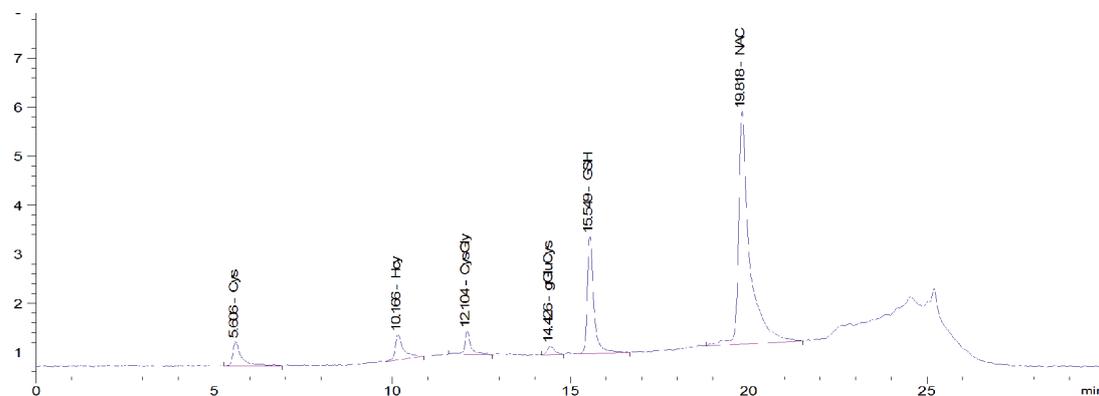


Рисунок 3 — Хроматограмма общих аминоктиолов плазмы крови

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что в сердце концентрации глутамина, треонина, аргинина, гипотаурина, таурина, тирозина и лизина коррелируют с их уровнями в плазме крови (табл. 1) Кроме того, уровень кинуреновой кислоты в плазме коррелирует с уровнем кинуренина в сердце ($r = 0,84$, здесь и далее $p < 0,05$), а уровень гомоцистеина в плазме — с уровнем кинуреновой кислоты в сердце ($r = 0,80$). Содержание таурина в сердце коррелировало с уровнем гипотаурина в сердце и плазме, но не цистеиновой и цистеинсульфиновой кислот.

В мышцах содержание фосфоэтаноламина, треонина, гипотаурина, но не таурина, тирозина, альфа-аминомасляной кислоты, валина, лейцина, лизина коррелировало с содержанием этих веществ в плазме. Кроме того, следует отметить наличие отрицательной корреляции уровней триптофана и кинуренина ($r = -0,80$), но не кинуреновой кислоты в мышцах, из чего может следовать, что в норме синтез кинуреновой кислоты мышцами, очевидно, не лимитируется доступностью кинуренина, в то время как последняя связана с превращениями триптофана, протекающими не в мышечной ткани.

В печени и плазме коррелировали уровни серина и глутамин, ансерина (подобной корреляции не наблюдалось в мышечной ткани), а также лизина. Имела место отрицательная корреляция уровня саркозина в печени и гомоцистеина в крови ($r = -0,77$). В то же время в печени наблюдались высокие корреляции уровня триптофана с уровнями АРУЦ и фенилаланина.

Эти данные позволяют считать пулы свободных аминокислот тканей и плазмы крови у интактных животных относительно независимыми друг от друга. Уровень гомоцистеина в плазме крови не имеет устойчивых взаимосвязей с уровнями отдельных аминокислот в тканях.

Таблица 1 — Содержание свободных аминокислот и родственных соединений, аминоктиолов и пуринов в плазме крови (мкмоль/л), свободных аминокислот и родственных соединений в тканях (нмоль/г ткани) интактных крыс

Показатель	Плазма n = 10	Сердце n = 9	Мышцы n = 9	Печень n = 9
CA	0,578 ± 0,0924	7,52 ± 1,444	4,035 ± 0,4678	5,57 ± 0,6353
PSer	0,766 ± 0,0652	18,48 ± 1,523	8,175 ± 0,9152	115,39 ± 35,475
CSA	0,565 ± 0,0778	4,80 ± 1,110	2,450 ± 0,6396	9,18 ± 1,1566
Asp	25,511 ± 4,0888	3241,4 ± 245,55	601,02 ± 109,21	1563,7 ± 233,03
GSH	2,178 ± 0,1978	4762,2 ± 141,33	1577,04 ± 75,74	12366,9 ± 481,5

Показатель	Плазма n = 10	Сердце n = 9	Мышцы n = 9	Печень n = 9
HCA	0,204 ± 0,0339	21,45 ± 2,060	8,622 ± 0,9847	83,39 ± 12,8229
Glu	179,76 ± 14,466	7942,1 ± 312,73	2285,2 ± 149,90	3750,7 ± 191,44
Asn	63,446 ± 3,7717	345,35 ± 21,911	244,79 ± 20,198	158,6 ± 10,917
Ser	203,68 ± 16,070	1062,1 ± 80,9	1331,5 ± 102,0	1827,9 ± 222,6
aAAA	0,964 ± 0,1579	3,92 ± 0,643	4,356 ± 0,5741	13,49 ± 1,5496
Gln	492,15 ± 27,47	8360,3 ± 506,7	3817,2 ± 308,77	7978,5 ± 399,82
His	85,605 ± 3,6714	115,73 ± 9,653	253,37 ± 18,342	1036,2 ± 34,008
3MHis	6,511 ± 0,3752	4,41 ± 0,437	12,838 ± 0,8863	4,07 ± 0,4540
Hse	0,348 ± 0,0450	1,14 ± 0,210	1,572 ± 0,1501	2,58 ± 0,5520
Gly	205,34 ± 12,197	1405,96 ± 66,96	2501,5 ± 196,11	2562,0 ± 204,21
PEA	9,636 ± 0,6559	799,70 ± 35,794	267,86 ± 35,863	1348,3 ± 164,20
Thr	235,01 ± 19,385	270,30 ± 24,345	814,58 ± 104,04	430,85 ± 38,517
1MHis	2,850 ± 0,2729	2,01 ± 0,387	3,863 ± 0,1919	3,15 ± 0,4884
Ctr	88,748 ± 4,1602	309,39 ± 23,524	357,30 ± 26,821	57,68 ± 5,4670
Arg	149,24 ± 9,709	295,96 ± 13,138	275,87 ± 50,537	39,49 ± 6,0264
Ans	3,856 ± 0,4232	38,10 ± 3,813	2651,4 ± 294,25	4,20 ± 0,3932
bAla	2,613 ± 0,1931	2,30 ± 0,246	35,753 ± 11,984	166,04 ± 17,527
Car	3,351 ± 0,3583	70,63 ± 9,037	3812,0 ± 382,44	19,10 ± 3,3612
HpTau	1,998 ± 0,3837	481,92 ± 75,357	115,27 ± 21,459	94,07 ± 14,7603
Ala	724,28 ± 49,552	2351,19 ± 72,52	4451,0 ± 351,56	4334,1 ± 318,85
Tau	108,141 ± 9,265	29516 ± 1611,3	7649,2 ± 771,5	957,66 ± 40,571
bABA	0,326 ± 0,0339	0,80 ± 0,163	2,087 ± 0,1761	11,55 ± 1,4709
GABA	5,856 ± 2,1730	16,46 ± 3,054	3,966 ± 0,1986	33,02 ± 5,8222
Tyr	84,801 ± 4,8226	117,78 ± 7,784	184,16 ± 12,156	266,93 ± 7,7202
aABA	6,496 ± 0,5843	13,91 ± 1,190	12,497 ± 1,5787	23,73 ± 1,5843
EA	14,624 ± 1,3244	47,44 ± 1,980	32,458 ± 2,4291	64,08 ± 4,5816
Val	170,72 ± 8,575	176,72 ± 6,120	282,72 ± 8,964	250,82 ± 12,36
Met	41,347 ± 2,1543	77,42 ± 2,281	46,658 ± 1,8283	50,42 ± 3,3329
Ctn	3,425 ± 0,3540	14,03 ± 2,129	3547,3 ± 419,9	40,93 ± 5,2271
Trp	100,95 ± 4,41	89,13 ± 2,031	111,46 ± 6,254	81,31 ± 4,2446
Phe	55,492 ± 2,5824	151,55 ± 2,604	139,40 ± 4,145	110,06 ± 3,7678
Ile	76,798 ± 3,6430	82,07 ± 3,153	119,29 ± 3,332	139,64 ± 6,3903
Leu	136,39 ± 7,117	203,58 ± 7,169	191,97 ± 3,930	254,41 ± 12,23
HLys	4,636 ± 0,3602	15,03 ± 1,810	14,631 ± 0,4581	24,01 ± 1,3065
Orn	35,340 ± 2,4901	63,54 ± 6,346	144,05 ± 10,316	318,97 ± 29,81
Lys	175,10 ± 31,141	256,00 ± 48,288	665,43 ± 260,28	238,26 ± 58,568
HPro	87,401 ± 5,7396	57,19 ± 4,112	203,58 ± 21,145	26,06 ± 2,6271
Sar	13,565 ± 1,1325	3,92 ± 0,450	23,511 ± 2,6195	24,92 ± 2,5675
Pro	1508,0 ± 133,19	540,85 ± 42,827	1135,25 ± 89,86	235,35 ± 23,166
KYN	3,640 ± 0,2333	4,26 ± 0,385	17,414 ± 7,1060	2,36 ± 0,1467
KYNA	0,069 ± 0,0081	0,09 ± 0,009	3,123 ± 1,2734	0,16 ± 0,0179
Hcy	8,398 ± 0,5078	не опр.	не опр.	не опр.

Заключение. 1. Пулы свободных аминокислот тканей и плазмы крови интактных животных относительно независимы друг от друга.

2. Уровень гомоцистеина в плазме крови в норме не имеет устойчивых взаимосвязей с уровнями отдельных серосодержащих аминокислот в тканях.

3. В норме синтез кинуреновой кислоты мышцами не лимитируется доступностью кинуренина.

Список литературы

1. Дорошенко, Е.М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности / Е.М. Дорошенко, В.А. Снежицкий, В.В. Лелевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2017. — Т. 15, № 5. — С. 551–556.
2. Дорошенко, Е.М. Лабораторно-диагностическая технология одновременного определения в пробе анализируемого материала (ткани, биологической жидкости) гомоцистеина и других физиологически активных аминотиолов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е.М. Дорошенко, Я.И. Новогродская // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2020. — Т. 9, № 1–2. — С. 135–143.
3. Новогродская, Я.И. Уровни гомоцистеина и показатели пула свободных серосодержащих соединений в плазме крови и печени крыс на фоне острого введения морфина гидрохлорида в различных дозах / Я.И. Новогродская, Е.М. Дорошенко, М.Н. Курбат // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2014. — Т. 45, № 1. — С. 47–50.
4. Особенности обмена ГАМК и нейроактивные аминокислоты в головном мозге белых крыс в динамике морфинового абстинентного синдрома / А.Г. Веницкая [и др.] // Биомедицинская химия. — 2007. — Т. 53. Вып. 4. — С. 427–434.
5. Ранняя диагностика нарушений метаболизма серосодержащих аминокислот у больных подагрой / Д.В. Пицко [и др.] // Здоровоохранение. — 2010. — № 2. — С. 64–67.
6. Смирнов, В.Ю. Пулы свободных аминокислот крови, периферических тканей и головного мозга при хронической интоксикации у крыс / В.Ю. Смирнов, Ю.Е. Разводовский, Е.М. Дорошенко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2014. — № 4. — С. 70–74.
7. Характеристика обмена триптофана и серусодержащих аминокислот в плазме крови, тромбоцитах больных ИБС с желудочковыми нарушениями ритма и ХСН / Е.М. Дорошенко [и др.] // Актуальные проблемы медицины. Материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции 22 января 2013 г. — Гродно : ГрГМУ, 2013. — В 2-х частях. Ч. 1. — С. 231–235.
8. Шейбак, В.М. Аминокислоты и иммунная система / В.М. Шейбак, М.В. Горецкая — М. : Пальмир. — 2010. — 356 с.
9. Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats / R.H. Mendes [et al.] // Auton. Neurosci. — 2014. — Vol. 180. — P. 43–47.
10. Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects / A.N. Fonteh [et al.] // Amino Acids. — 2007. — Vol. 32, № 2. — P. 213–224.

TISSUE-SPECIFIC CHARACTERISTICS OF THE POOL OF FREE AMINO ACIDS AND THEIR DERIVATIVES IN INTACT RATS

Doroshenko Ye.M., Zulpiev S.N.

*Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The content of components of the pool of free amino acids and related compounds was studied in tissues of intact rats. The tissue and plasma pools of free amino acids in intact rats were relatively independent and did not correlate. The plasma homocysteine level was not in stable interrelationships with the levels of other sulfur-contained compounds in tissues. The synthesis of kynurenic acid by muscle tissue was unlikely to be limited by the availability of kynurenine.*

РОЛЬ СЕЛЕНА И ЦИНКА В КОРРЕКЦИИ НЕКОТОРЫХ ВИРУСНЫХ ПАТОЛОГИЙ

Ермаков В.В.¹, Йованович Л.Н.², Мойсеёнок А.Г.³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции «Институт геохимии и аналитической химии имени В.И. Вернадского Российской академии наук», г. Москва, Российская Федерация;

²Альфа БК университет, Белград, Сербия;

³Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь

Резюме. Обзор литературы посвящен новому направлению в биогеохимии и геохимической экологии — связи микромира (вирусов) с проявлениями патологий животных и человека. Рассмотрены некоторые аспекты биологического действия селена и цинка, их влияние на вирусные инфекции. Обсуждаются вопросы неоднозначных результатов по коррекции патологий.

Введение. В последние десятилетия человечество все острее испытывает отрицательное воздействие последствий ускоренного техногенного развития. Результатом такого развития явились многочисленные экологические проблемы: кислотные дожди, озоновые дыры, загрязнение природной среды вредными химическими элементами и суфицит токсичных химических соединений, а также дефицит эссенциальных микроэлементов в почве, которые ведут к появлению пандемий новых, неизвестных ранее заболеваний. К таким заболеваниям можно отнести синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), вирусные гепатиты и Коксаки, болезнь Эбола, «бешенство» крупного рогатого скота, а также синдромы и болезни, вызываемые вирусом птичьего гриппа (САРС-1), вирусом Корона(САРС-2) (COVID-19), а также синдром Кавасаки у детей.

Однако конкретные механизмы, связывающие глобальные изменения в ноосфере с теми или иными болезнями, пока еще не раскрыты, что значительно затрудняет принятие адекватных мер и синтеза новых эффективных лекарственных препаратов для лечения заболеваний. Вместе с тем за последние 20 лет наметился определенный прогресс и в этой области.

Селен

Биологическая роль селена. Многочисленные исследования показывают, что один из химических элементов, вернее его недостаток в питании человека играет критическую роль в развитии самых опасных болезней нашего времени. Этим микроэлементом является селен [2, 5, 17, 20].

История изучения биологической роли селена включает 3 периода. До 1957 г. селен и его соединения считали исключительно токсичными для организмов. Причина этого — массовые отравления скота в некоторых районах Великой равнины США. Следующим этапом интереса к селену является открытие К. Шварца и С. Фольца в 1957 г. по предотвращению развития некроза печени крыс и эксудативного диатеза цыплят очень низкими дозами селенита натрия. Это послужило началом использования соединений селена в терапии беломышечной болезни животных и других заболеваний [35].

Третий этап — открытие селенсодержащего фермента глутатионпероксидазы, регулирующего антиоксидантное состояние организма и выявление обширных территорий с недостатком селена в среде, кормах и продуктах питания [2, 21]. Тем не менее, биохимические функции

селена у животных и человека не были известны до 1973 г. В 1973 г. почти одновременно Дж. Ротрак и соавт. [33], а также группа немецких ученых под руководством Л. Флое [22] продемонстрировали, что селен входит в состав молекулы ранее известного фермента глутатионпероксидазы (СРх), который, подобно каталазе, защищает мембраны эритроцитов от окисления, разрушая перекись водорода. Следует заметить, что открытие глутатионпероксидаз в эритроцитах было сделано еще в 1957 г. [29], но тогда не было известно о существовании фермента, содержащего селен.

Дефицит селена в среде был установлен практически одновременно в 60-е гг. прошлого столетия в Новой Зеландии, Австралии, США и Восточном Забайкалье [2, 4, 21].

Современный интерес к биологическому значению селена не ослабевает, его физиологические и биохимические функции четко определены, но создание и внедрение новых эффективных и безопасных препаратов протекает медленно, несмотря на массу малопробированных средств.

В последнее время доказано наличие целого семейства селенсодержащих глутатионпероксидаз, которые могут действовать и против различных органических гидропероксидов в самых разных клетках животных. К настоящему времени обнаружено уже около 30 селенопротеинов, каждый из которых играет немаловажную роль в клеточной биохимии.

Селенопротеинами помимо различных глутатионпероксидаз являются три деиодиназы, несколько тиоредоксинредуктаз, селенофосфатсинтетаза 2, селенопротеин Р, селенопротеин W, селенопротеин О, селенопротеин R и ряд других биологически активных селенопротеинов, функция которых пока недостаточно изучена [6, 8, 11, 13, 30] (рис. 1).

Селен абсолютно необходим для роста клеток организма [14]. Например, культуры иммунных и нервных клеток растут на бессывороточных средах только при добавлении селена, инсулина и трансферрина.

Значение селена в профилактике и лечении вирусных заболеваний. Представляет интерес связь недостатка микроэлементов с этиологией вирусных заболеваний [3]. Так, установлена трансформация невирулентного РНК-го вируса Коксаки типа В3 (СVB3/0) в вирулентный у мышей при содержании их на рационе с недостатком селена в результате необратимой мутации, связанной с видоизменением структуры генома [12, 25]. По-видимому, это имеет непосредственное отношение к миопатии — эндемической болезни Кешана, распространенной в районах КНР с недостатком селена в среде. На конгрессах по проблемам биологической роли микроэлементов (Бангкок, 2005; Херсонес, 2007; Санкт-Петербург, 2017) неоднократно подчеркивалась роль селена, цинка и других микроэлементов в патогенезе некоторых бактериальных и вирусных заболеваний человека и животных. В связи с этим проблема оценки недостаточности микроэлементов приобретает особую актуальность.

Представляют несомненный интерес микроэлементные взаимодействия хозяин-паразит, хозяин-микроорганизмы. Известно, что организм человека и животных аккумулирует необходимые микроэлементы, такие как железо, марганец, медь и цинк, с конкретными соединениями (включая белки), чтобы резервировать эти металлы от вторжения патогенов («пищевой иммунитет»). Таким образом, связывание металлов отражается на устойчивости к инфекции. Статус селена также может влиять на взаимодействие хозяин-патоген, но патогены имеют механизмы противодействия этой защитной способности хозяина. Как микроорганизмы, так и паразиты (гельминты) весьма устойчивы к воздействию особо высоких, а следовательно, токсичных уровней ионов металлов. Вторичный защитный механизм обусловлен продуцированием (врожденными иммунными клетками хозяина) реактивного кислорода и азота, что также может при-

вести к повреждению тканей хозяина. Кроме того, газотрансмиттеры оксида азота (оксидант) и оксида углерода косвенно участвуют в побочных эффектах (депротекция и защита, связанные с метаболизмом гема), возникающих в результате иммунного ответа.

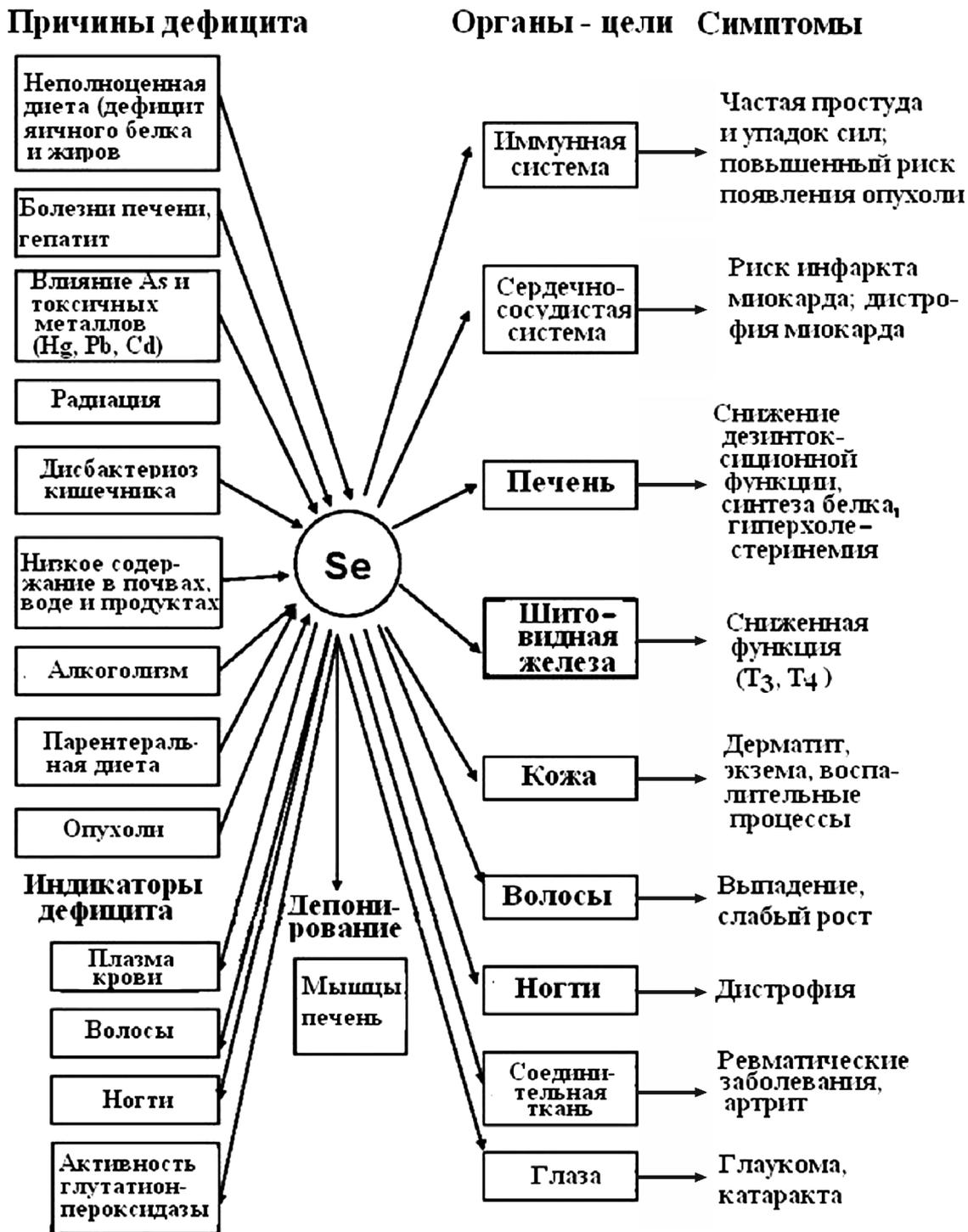


Рисунок 1 — Влияние дефицита Se на здоровье человека

Доказательства важной роли селена в возникновении и развитии СПИДа получены в ряде исследований. Вначале было замечено, что распространение СПИДа географически связано с областями низкого содержания селена в почвах. В Африке в селенодефицитных областях инфекция ВИЧ приобрела пандемический характер: от СПИДа страдает свыше четверти населения.

При пониженном уровне селена наблюдается повышенная смертность от СПИДа. Исследования, проведенные Э.Тэйлором также показывают, что СПИД, саркома Карпоши и другие раковые образования более распространены в областях с селенодефицитными почвами, что справедливо, по-видимому, не только применительно к Африке, но и к распространению СПИДа во всем мире [37, 38].

Дефицит селена в значительной мере влияет на выживание пациентов, зараженных ВИЧ. Об этом впервые сообщила группа исследователей, возглавляемая Марианной К. Баум из Университета Майами, США, которая обнаружила, что зараженные ВИЧ-1 пациенты с дефицитом селена, умирают от связанных с ВИЧ причин в 19.9 раз чаще, чем пациенты с адекватными уровнями селена. Из всех исследованных веществ селен имел наиболее сильно выраженный эффект на число смертельных исходов при заболевании СПИДом. Авторы предположили, что взаимосвязь между дефицитом селена и смертностью при СПИДе связана с ролью селена как антиоксиданта и/или его воздействием на регуляцию активности генов в ответ на ВИЧ-инфекцию [39, 41, 42, 46].

Тэйлор предположил, что важную роль в регулировании проявления ВИЧ, должны играть селенопротеины, а именно — глутатионпероксидаза. Он предложил новый вирусный механизм, согласно которому ВИЧ вносит вклад в снижение уровня селена, ускоряя прогрессию болезни: в то время, как нормальный уровень селена, возможно, предотвращает размножение вируса и таким образом задерживает прогрессирование болезни [37]. Впоследствии, чтобы доказать, что часть генома ВИЧ-1 действительно кодирует селеноэнзим глутатионпероксидазу млекопитающих, Е. Тэйлори и соавторы клонировали этот гипотетический ВИЧ-1 ген и осуществили его трансфекцию в почечные клетки собаки и клетки МСР7 [37, 39]. В обоих случаях в клетках, приобретших ген ВИЧ-1, сильно увеличился синтез селеноэнзима глутатионпероксидазы. Это убедительно доказывает, что ВИЧ-1 (и вероятно также ВИЧ-2, вирус Коксаки В, вирусы гепатитов В и С) способны производить глутатионпероксидазу для своих собственных нужд. В свете этих данных, казалось бы, логично ожидать, что инфекции от этих патогенов будут минимальными в регионах с высоким содержанием селена. Однако в действительности появились многочисленные свидетельства обратного — высокоедаетическое потребление селена приводит к большей устойчивости организма ко всем указанным вирусам [16, 18].

Для взрослых и детей, болеющих СПИДом, характерны как резкий недостаток селена в плазме крови, так и сниженное число Т-хелперов или CD4 клеток. Известно, что эти лимфоциты являются основной мишенью действия ВИЧ. Г. Фостер [23] утверждает, что падение уровней селена вызывает сокращение CD4 клеток, что, в свою очередь, вызывает снижение селена в сыворотке крови.

Г. Фостер [23] отмечает, что и некоторые другие вирусы, подобно ВИЧ, также снижают содержание селена, причем их геном также содержит ген человеческого фермента глутатионпероксидазы, что позволяет вирусу неограниченно размножаться, истощая глутатион организма хозяина, который является ингибитором обратной транскриптазы — фермента, необходимого для репликации вируса. Эта группа вирусов включала ВИЧ-1 и ВИЧ-2, а также вирус Коксаки В и вирусы гепатитов В и С [3, 12, 25, 37, 23].

Биологическая роль селена неоднократно подчеркивалась при изучении вирусных инфекций, обусловленных COVID-19 [28]. Так, ученые университета Суррея (КНР) установили достоверную корреляцию между содержанием селена в рационе и процентом выздоровления или летальных исходов пациентов с болезнью COVID-19. В провинциях с высоким содержанием селена в почве наблюдалась меньшая смертность от коронавируса COVID-19 по сравнению с районами, где наблюдается дефицит этого микроэлемента [43, 44] (рис. 2).

Экологические причины дефицита селена. Общеизвестно, что наиболее сильно загрязняет воздух промышленное производство — сжигание углеводородов для нужд энергетики (образование золы), а также выхлопные выбросы различных двигателей, в том числе, автомобилей, самолетов, мотоциклов. Снижение уровня селена в сыворотке крови можно наблюдать у жителей крупных промышленных городов и работников химической промышленности.

В целом, три главных фактора вносят вклад в дефицит селена в почве. Кислотные дожди, вызванные большими количествами серы и азота в воздухе, которые в атмосфере превращаются в серную и азотную кислоты, изменяют способность почвы связывать элементы при нейтральном или слабощелочном pH. Изменение баланса pH увеличивает биодоступность одних элементов (в основном токсичных) и уменьшает биодоступность других — таких, как селен, цинк, магний. Таким образом, окисление почвы понижает содержание селена и цинка в глобальной цепи питания, что, вероятно, вносит вклад в быстрый рост числа раковых заболеваний, СПИДа и COVID-19.

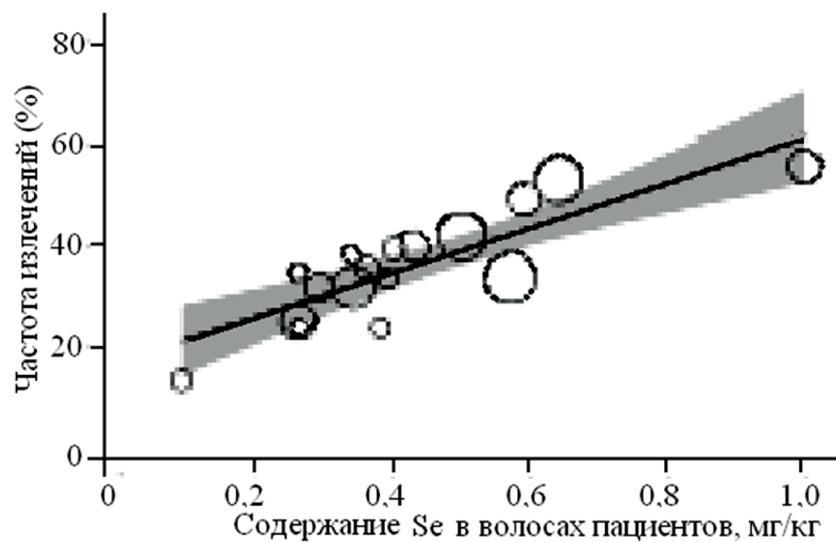


Рисунок 2 — Корреляция между частотой излечения COVID-19 в 17 городах за пределами Хубэя (Китай, 18 февраля 2020 г.) и селеновым статусом городского населения (концентрация селена в волосах) анализировалась с использованием взвешенной линейной регрессии (среднее значение \pm SD = 35,5 + 11,1, $R^2 = 0,72$, F-тест $P < 0,0001$). Каждая точка данных представляет собой степень излечения, рассчитанную как число вылеченных пациентов, деленное на число подтвержденных случаев, выраженное в процентах. Размер маркера пропорционален количеству случаев. ■ 95 % Ди; — подобранные значения; O — степень излечения [44]

Существенная роль в снижении экологического статуса селена в биосфере принадлежит техногенной составляющей. В частности, в условиях интенсивного использования фосфорсодержащих удобрений и экстенсивного земледелия снижается усвоение микроэлемента растениями [2, 4].

Повышение кислотности почвы влияет на качество почвы, что приводит к увеличению подвижности ионов тяжелых металлов и алюминия. Это увеличивает скорость выщелачивания ионов тяжелых металлов из почвы и их поглощения корневой системой растений. Интенсивность поглощения тяжелых металлов растениями зависит не только от содержания металлов в почве, но и от взаимодействия с ионами других металлов. В связи с повышением кислотности почвы происходит увеличение подвижности и устранение из верхних слоев почвы эссенци-

альных (биологически важных) химических элементов, таких как Se, Zn, Mg, Ca и других металлов (рис. 3).

Таким образом, снижается питательная ценность сначала растительных культур, а затем — и пищевых продуктов. Пищевые цепи содержат все меньше биологически важных элементов [31].

Производство хлорфторуглеродов во второй половине 20-го столетия обусловило повреждение озонового слоя, поглощающего избыток ультрафиолетовой радиации. Облучение повышенным количеством ультрафиолета уменьшает концентрацию Т-лимфоцитов-хелперов и Т-лимфоцитов-супрессоров в крови, усиливая тем самым восприимчивость организма к болезням (особенно вирусным) [16]. Не решена проблема дезинтоксикации высокотоксичных и персистентных пестицидов в среде обитания организмов.

Химические загрязнения также повреждают иммунную систему организма и уменьшают устойчивость к заболеваниям. По подсчетам ВОЗ, имеется около 5 000 000 случаев заболеваний, связанных с пестицидами, что ежегодно приводит к 20 000 смертей от них.

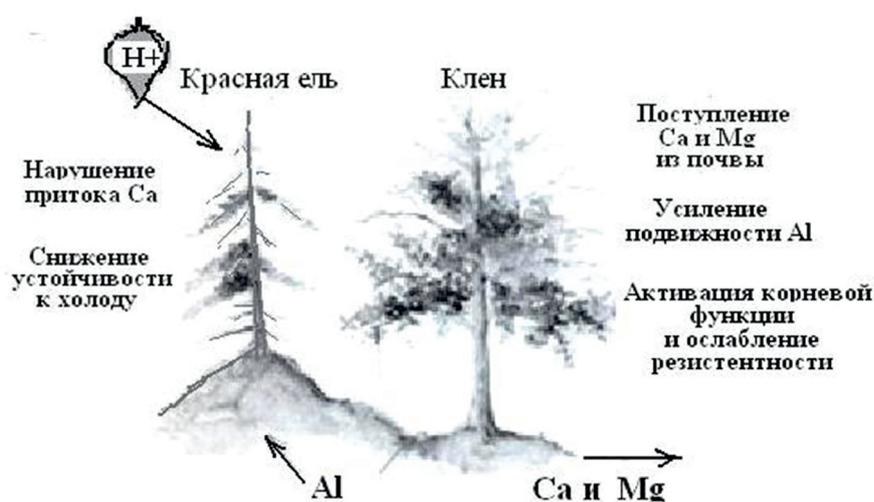


Рисунок 3 — Влияние кислотных дождей на развитие растительности [31].

Значение пищевых добавок для роста иммунитета. В связи с ухудшением экологической обстановки, недостаточным количеством протеинов и витаминов в рационе питания населения, а также дефицитом эссенциальных элементов, прежде всего селена, в продуктах питания вследствие применения современных интенсивных методов сельскохозяйственного производства происходит ослабление селенового статуса населения на фоне общего ослабления иммунитета [2, 4].

Роль пищевых добавок в предотвращении и лечении болезни очевидна. Сооткрыватель ВИЧ профессор Люк Монтанье [29] утверждает, что СПИД характеризуется устойчивым окислительным дисбалансом и уменьшением уровня глутатиона в крови пациентов. Изменения биохимических маркеров приводят к системному окислительному стрессу. Ученый полагает, что антиоксиданты полезны для подавления репликации вируса и апоптоза у пациентов со СПИДом.

Следует заметить, что из препаратов, используемых для повышения иммунитета часто применяется GE132 Plus. Это диетический препарат, который содержит комбинацию нескольких действенных высокоэффективных антиоксидантов. Состав препарата: экстракт Рейши грибов — 180 мг, маточное молочко — 160 мг, куркума, бета-глутатион, resveratrol — 100 мг, ликопен — 35 мг, sulforafan — 25 мг [7].

Лечение вирусных заболеваний. Лечение большинства вирусных заболеваний в период пандемий в основном сводится к назначению пациентам противомаларийных препаратов и антибиотиков (азитромицин). В отдельных случаях, как например, в случае Кавасаки синдрома у детей сразу назначают иммуноглобулин [26, 43, 44].

В терапии COVID-19 нашли применение такие против малярийные лекарственные препараты, как Хинин — алкалоид хинного дерева, является самым старым лекарственным препаратом в лечении малярии. Используют также акрихин, хлорохин, хипоцид, примахин, которые применяются свыше 50 лет. Хиноцид и примахин — убивают шизонтов в крови и служат для превентивной формы предупреждения рецидивов 3-х и 4-дневной малярии. Бигумаль служит против эритроцитарных форм плазмодий. В течение многих десятилетий считалось, что назначение здоровым людям хлорохина служит как химиопрофилактика. Однако в мае этого года в журнале «Ланцет» объявлены данные о противопоказании назначения хлорохина (гидрооксихлорохина) пациентам с аритмией из-за опасности летальных исходов. Против других заболеваний рекомендуется прием: акрихина — против амебиаза, лямблиоза, лейшманиоза; хлородина — против токсоплазмоза. В лечении COVID-19 также, в основном, применяют старые препараты, которые не всегда действенны [26, 44, 46].

Цинк

Биологическая роль цинка. Цинк — жизненно важный микроэлемент для всех организмов [6, 9, 46]. Он не только присутствует в растениях, животных и организме человека, но и участвует в реализации жизненно важных функций, отраженных на рис. 4. Млекопитающие умеренно регулируют пул цинка за счет регуляции его всасывания в кишечнике, взаимодействия с глутатионом и металлотионеинами. Именно избыток цинка в клеточном цитозоле индуцирует синтез металлотионеинов, обеспечивая его относительный гомеостаз.

Если токсическое действие избытка цинка в организме встречается крайне редко, то дефицит этого микроэлемента наблюдается часто. К патологиям, связанным с недостатком цинка в среде и продуктах питания, относят ряд гормональных заболеваний, расстройства функций воспроизведения, пищеварения, алкоголизм, серповидноклеточную анемию, почечную недостаточность, ряд заболеваний печени, болезнь Крона и желудочно-кишечные расстройства (рис. 4). Особую роль цинк играет в процессах, связанных с иммунитетом и блокированием бактериальных и вирусных патологий [7, 24].

Известно, что цинк участвует в передаче генетической информации практически на всех ее этапах. Он является незаменимым компонентом свыше 20 ДНК- и РНК-полимераз и может сам функционировать в качестве неэнзиматической полимеразы *in vitro*. Он входит также в состав свыше 200 содержащих «цинковые пальцы» белков, регулирующих генетические процессы и выполняющих в большинстве случаев функцию факторов активации транскрипции. Эта функция заключается обычно в том, что они, узнавая определенные последовательности ДНК, обеспечивают связывание с ними специфических регуляторных белков. Цинк является также компонентом аминоксил-тРНК-синтетаз и фактора трансляции EF-1 [9, 19, 32].

Необходимость цинка для иммунной системы была известна на протяжении десятилетий. Дефицит цинка всегда приводит к иммунодефициту [32]. Как правило, следует различать общее влияние цинка на клеточный цикл и пролиферацию и специфические эффекты на клетки иммунной системы. Поскольку иммунная система — система органа с самым высоким уровнем распространения в человеческом теле (например, 80 миллионов нейтрофилов высвобождаются из костного мозга в минуту), любой дефицит микроэлементов с влиянием на пролиферацию клеток позволит снизить иммунную реакцию из-за лейкопении.

Однако несколько специфических влияний цинка на иммунную систему известны [19]. Первое наблюдение выявило снижение количества Т-клеток вследствие атрофии тимуса, вызванной потерей активного тимулина — нонапептидного гормона тимуса, который активен в его Zn-связанном состоянии (рис. 5).

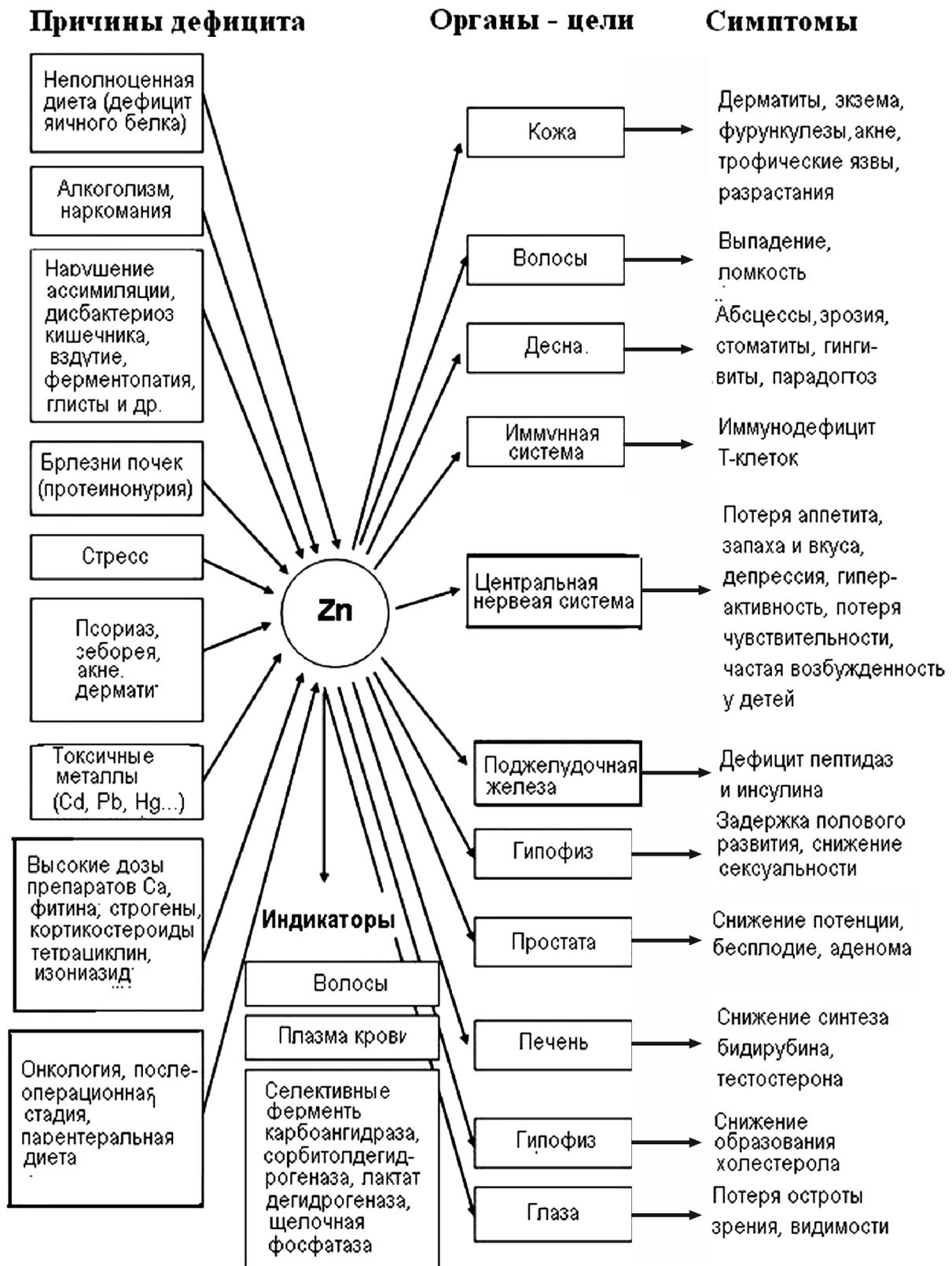


Рисунок 4 — Влияние дефицита Zn на здоровье человека

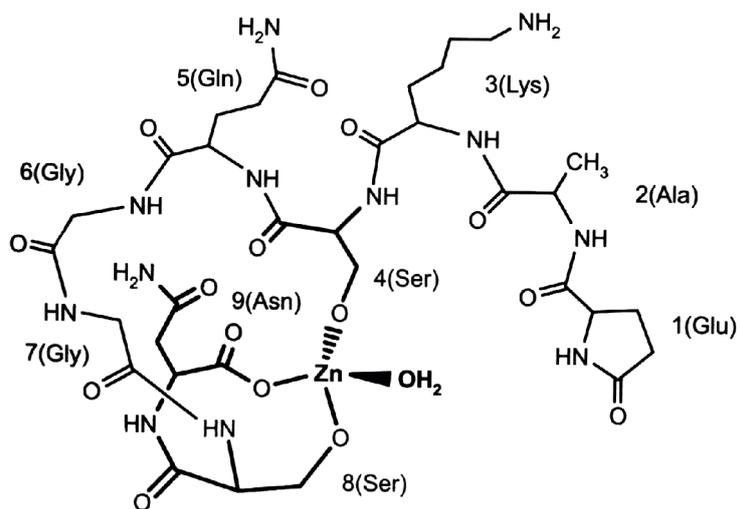


Рисунок 5 — Связывание Zn^{2+} в тимулине (активная форма тимулина) [19]

Тимулин участвует в дифференциации Т-клеток. Влияние дефицита цинка на систему В-лимфоцитов является менее выраженным. Никакого влияния на зрелые В-клетки не существует, тогда как число В-клеток предшественника уменьшается. Количество моноцитов/макрофагов и дендритных клеток увеличивается при дефиците цинка, поскольку дефицит цинка способствует дифференциации миелоидных клеток в моноцитах/макрофагах, а также в дендритных клетках созревания. Дифференциация нейтрофилов однако не зависит от Zn-дефицита [28].

Принципиальная клиническая особенность острого дефицита цинка у человека — задержка роста. Она также приведет к нарушению иммунной системы, к аллергии, потере запаха и вкуса, выпадению волос, белым пятнам под ногтями, к проблемами кожи и нарушению сна. Последствия маргинального или слабого дефицита цинка менее очевидны и могут быть легко преодолены. Снижение темпов роста и ослабление устойчивости к инфекции часто являются единственными проявлениями слабого дефицита цинка у человека.

Симптомы токсичности возникают при повышенном потреблении цинка (4–8 г) и могут нанести вред иммунной системе, а не помочь ей. Кроме того, было показано, что длительное воздействие высоких доз потребления цинка существенно превышает требования, что приводит к нарушению обмена веществ и других микроэлементов. Использование меди особенно чувствительно к избытку цинка [15].

Взаимодействие, вызванное высоким потреблением железа, как представляется, усиливается при увеличении потребления аскорбата. Пагубное воздействие цинка на усвоение железа индуцировано соотношением железо:цинк 2:1 и также ухудшается снижением содержания диетического аскорбата при высоком содержании диетического фитата. Возможно, антагонизм зависит не от общего уровня железа, а от доли железа, присутствующего в окисленной или восстановленной форме [34].

Необходимо отметить, что цинк и железо присутствуют в организме млекопитающих практически в одних и тех же количествах. Кроме того, потребление цинка не должно превышать 100 мг/сутки. Потребление железа в больших количествах может привести к тошноте, диарее, головокружению, сонливости и галлюцинациям [27].

Основные источники цинка: красное мясо, птица, рыба, зерновые, орехи, яйца и семена. Зеленые листовые овощи и фрукты являются лишь скромными источниками цинка из-за высокого содержания воды [6].

Полагают, что канцерогенное действие тяжелых металлов, замещающих цинк в факторах транскрипции, объясняется генерированием ими свободных радикалов, повреждающих ДНК. В настоящее время ведется конструирование искусственных факторов транскрипции с цинковыми пальцами, узнающими известные последовательности ДНК (ТАТА-бокс и сайт связывания р53) или синтетические олигонуклеотиды длиной 18–27 п.о. Создание искусственных факторов транскрипции, позволяющих адресно регулировать экспрессию определенных генов, открывает принципиально новые подходы в области молекулярно-генетических исследований и лечении широкого круга заболеваний, включая рак [9, 46].

Цинк и вирусы. Таким образом, цинк модулирует противовирусный и антибактериальный иммунитет и регулирует воспалительные реакции в организме человека и животных. Несмотря на отсутствие широких клинических исследований, существуют данные о том, что модуляция цинкового статуса может быть важной при COVID-19. Так, опыты *in vitro* показывают, что Zn^{2+} обладает противовирусной активностью за счет ингибирования РНК-полимеразы SARS-CoV-2. Этот эффект может лежать в основе терапевтической эффективности хлорохина, известного как ионофор цинка. Косвенные данные также указывают на то, что Zn^{2+} может снижать активность ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), являющегося рецептором для вируса SARS-CoV-2 [9, 46].

Усиление противовирусных иммунных реакций, активируемых цинком, может происходить в результате повышения синтеза некоторых компонентов интерферона. При этом цинк, обладая противовоспалительной активностью, в ряде случаев способствует снижению развития бактериальной инфекции. Благодаря своим иммуностимулирующим свойствам, цинк входит в число БАД при простуде. Однако результаты исследований о лечебном эффекте препаратов цинка при простудных заболеваниях противоречивы [36, 40].

В связи с возникшей пандемией, вызванной коронавирусом COVID-19 соединения цинка и селена в сочетании с другими препаратами (хлорохин, гидроксихлорохин) проходят испытания в КНР и Италии для снижения патологических проявлений заболевания [16]. Ученые подчеркивают, что комбинация цинка и транспортной молекулы цинка (ионофора) облегчает проникновение цинка в клетки, эффективно подавляя репликацию РНК-вирусов [10]. Представляет интерес комбинация соединений цинка с флавоноидами (квертицин). По-видимому, в данном случае усиливается антиоксидантное действие препаратов при развитии патологий, обусловленных как бактериями, так и вирусами. Однако существуют неоднозначные заключения [26].

Заключение. Приведенные выше факты участия селена и цинка в укреплении иммунитета, а также в предотвращении развития рака, некоторых опасных вирусных заболеваний (гепатит, геморрагическая лихорадка эбола, COVID-19) свидетельствуют о новых грянях биологической роли микроэлементов. Оба микроэлемента профилактируют сердечно-сосудистые заболевания, участвуют в регулировании репродуктивных функций и работы щитовидной железы, предупреждении развития катаракты и других офтальмологических заболеваний. Это, несомненно, указывает на важность селена и цинка в поддержании здоровья населения.

В определенной мере развитие этих патологических явлений связано с уменьшением биодоступности микроэлементов в результате существенного ухудшения экологической обстановки (увеличение кислотности почв, вод) и качества продуктов питания. Особую отрицательную роль играют техногенные факторы (интенсивное применение фосфорсодержащих удобрений, загрязнение органическими и минеральными компонентами, промышленные катастрофы и войны). Все это требует тщательного изучения статуса как селена и цинка, так и других микроэлементов у населения, а также экспертных оценок их содержания в продуктах питания и среде.

Список литературы

1. Голубкина, Н.А. Селен в питании. Растения, животные, человек / Н.А. Голубкина, Т.Т. Папазян — М.: Печатный город, 2006. — 254 с.
2. Голубкина, Н.А. Внутрирегиональная вариабильность селенового статуса населения / Н.А. Голубкина, А.В. Синдирева, В.Ф. Зайцев // Медицинская экология. — 2017. — Т. 12, № 1. — С. 107–127.
3. Гусейнов, В.Г. Селен и некоторые вирусные заболевания / В.Г. Гусейнов, Н.С. Сафаров // Биомедицина. — 2007. — № 2. — С. 3–6.
4. Ермаков, В.В. Эволюция биогеохимических провинций в России / В.В. Ермаков // Изменение природной среды в XX веке / ответ. ред. В.М. Котляков, Д.И. Люри. — М.: Молнет. — 2012. — С. 307–321.
5. Ермаков, В.В. Биологическое значение селена / В.В. Ермаков, В.В. Ковальский. — М.: Наука, 1974. — 300 с.
6. Ермаков, В.В. Биогеохимическая индикация микроэлементозов / В.В. Ермаков, С.Ф. Тютиков, В.А. Сафонов. — М.: издание РАН, 2018. — 386 с.
7. Коронавирус сегодня [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://koronavirustoday.ru/info/lekarstvo-ot-koronavirusa-v-rossii-chem-lechat-v-stacionare-i-doma/>. — Дата доступа 16.06.2020.
8. Мохнач, В. Селеносодержащие ферменты и их значение в эндокринологии [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.health-ua.com/article/26117-selensoderzhashie-fermenty-iih-znachenie-vendokrinologii>. — Дата доступа 12.06.2020.
9. Риш, М.А. Наследственные микроэлементозы / М.А. Риш // Труды Биогеохим. лаб. М. : Наука, 2003. — Т. 24 : Техногенез и биогеохимическая эволюция таксонов биосферы. — С. 301–348.
10. Aartjan, J.W. Zn(2+) Inhibits Coronavirus and Arterivirus RNA Polymerase Activity in Vitro and Zinc Ionophores Block the Replication of These Viruses in Cell Culture / J.W. Aartjan, van den Worn, A.C. Sims // PLoS Pathogens. — 2010. — Vol. 6, № 11. — P. e1001176.
11. Arthur, Y.R. The Glutathione peroxidase / Y.R. Arthur // Cell Mol. Life. — 2000. — Vol. 556. — P. 1825–1835.
12. Beck, M.A. Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates / M.A. Beck, Q. Shi, V.C. Morris // Nat. Med. — 1995. — Vol. 1, № 5. — P. 433–436.
13. Behne, D. Mammalian selenium-containing proteins / D. Behne, A. Kyriakopoulos // Annu Rev Nutr. — 2001. — Vol. 21. — P. 453–473.
14. Cancer Net, National Cancer Institute, «Kaposi's Sarcoma Treatment — Health Professionals». — Mode of access: <http://cancel-net.nci.nih.gov/cgi-bin/srehcgi.exe?DBID=pdq&Type=search&VID=208+01>. — Date of access: 15th June, 2020.
15. Chan, S. The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health / C. Chan, B. Gerson, S. Subramaniam // Clin. Lab. Med. — 1998. — Vol. 18, № 4. — P. 673–685.
16. Clark, L.C. Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients with Carcinoma of the Skin. A Randomized Controlled Trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group / L.C. Clark, G.F. Combs, B.W. Turnbull // Journal of American Medical Association. — 1986. — Vol. 276. — P. 1957–1963.
17. Combs, G.F. Biomarker of selenium status / G.F. Combs // Nutrients. — 2015. — Vol. 7. — P. 2209–2236.
18. Combs, G.F. Chemopreventive agents: Selenium / G.F. Combs, W.P. Gray // Pharmacol Ther. — 1998. — Vol. 79. — P. 179–192.
19. Dardenne, M. Interactions between zinc and thymulin / M. Dardenne, P. Jean-Marie // Metal-Based Drugs. — 1994. — Vol. 1, № 2–3. — P. 233–239.
20. Ermakov, V. Selenium deficiency as a consequence of human activity and its correction / V. Ermakov, L. Jovanovic // J. Geochemical Exploration. — 2010. — Vol. 107, № 2. — P. 193–199.

21. Ermakov, V. Characteristics of selenium migration in soil-plant system of East Meshchera and Transbaikalia / V. Ermakov, L. Jovanovic // *J. Geochemical Exploration*. — 2010. — Vol. 107, № 2. — P. 200–205.
22. Flohe, L.W. Glutathion peroxidase: a selenoenzyme / L.W. Flohe, W.A. Gunzler, H.H. Schock // *FEBS Letters*. — 1973. — Vol. 32. — P. 132–134.
23. Foster, H.D. What really causes AIDS / H.D. Foster. — Victoria: Trafford Publishing, 2002. — 198 p.
24. Keen, C.L. Zinc Deficiency and Immune Function. Review / C.L. Keen, M.E. Gershwin // *Annu Rev Nutr*. — 1990. — Vol. 10. — P. 415–431.
25. Levander, O.A. Selenium and viral virulence / O.A. Levander, M.A. Beck // *Brit. Med. Bull.* — 1999. — Vol. 66, № 3. — P. 528–533.
26. Magagnoli, J. Outcomes of hydroxychloroquine usage in United States veterans hospitalized with Covid-19 / J. Magagnoli, S. Narendran, D. Pereira // *Med.* — 2020. — Mode of access: <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20065920>. — Date of access: 11th June, 2020.
27. Mehri, A. Trace Elements in Human Nutrition: A Review / A. Mehri, R.F. Marjan // *Int. J. Med. Invest.* — 2013. — Vol. 2, № 3. — P. 115–128.
28. Metals in Host-Microbe Interaction. The Host Perspective / D. Rehder [et al.] // *Trace Metals and Infectious Diseases*. Cambridge / eds. J.O. Nriagu, E.P. Skaar. — Massachusetts: The MIT Press, 2015. — P. 199–221.
29. Montagnier, L. Virus: the Co-Discoverer of HIV Tracks its Rampage and Charts the Future / L. Montagnier. — New York: WW Norton, 1999. — 256 p.
30. Patching, S.G. Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: a review / S.G. Patching, P.H.E. Gardiner // *J. Trace Elements Med. Biol.* — 1999. — Vol. 13. — P. 193–214.
31. Radosavljevic, Z. Challenges of green economy. International Monograph. / Z. Radosavljevic, L. Jovanovic, V. Ermakov — Belgrad: University Union-Nikola Tesla, 2018. — 236 p.
32. Rink, L. Zinc-altered immune function and cytokine production / L. Rink, H. Kirchner // *J.Nutr.* — 2000. — Vol. 130. — P. 1407S–1411S.
33. Rotruck, J. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase / J. Rotruck [et al.] // *Science*. — 1973. — Vol. 179, № 73. — P. 588–590.
34. Sandstrom, B. Effects of inorganic iron on the absorption of zinc from a test solution and a composite meal / B. Sandstrom // *Trace elements in man and animals-TEMA.5*/eds. C.D. Mills, L. Brenner, J.K. Chester. — Farnham Royal, CAB International, 1985. — P. 414–416.
35. Schwarz, K. Selenium as an integral part of factor 3 against necrotic dietary liver degeneration / K. Schwarz, C. Foltz // *J. Am. Chem. Soc.* — 1957. — Vol. 79. — P. 3292–3293.
36. Takkouche, B. Intake of Vitamin C and Zinc and Risk of Common Cold: A Cohort Study / B. Takkouche, C. Regueira-Méndez, R. Garcia-Closas // *Epidemiology*. — 2002. — Vol. 13, № 1. — P. 38–44.
37. Taylor, E.W. Selenium and viral diseases: facts and hypotheses / E.W. Taylor // *J. Orthomolecular Medicine*. — 1997. — Vol. 12, № 4. — P. 227–239.
38. Taylor, E.W. HIV-1 encodes a sequence overlapping env.gp41 with highly significant similarity to selenium dependent glutathione peroxidases / E.W. Taylor, A. Bhat, R.G. Nadimpalli // *J. AIDS Human Retrovirology*. — 1997. — Vol. 15, № 5. — P. 393–394.
39. Taylor, E. W. Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins / E.W. Taylor, R.G. Nadimpalli, C.S. Ramanathan // *Biol. Trace Elem. Res.* — 1997. — Vol. 56, № 1. — P. 63–91.
40. Turner, R.B. Effect of Treatment With Zinc Gluconate or Zinc Acetate on Experimental and Natural Colds / R.B. Turner, W.E. Cetnarowski // *Clin. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 31, № 5. — P. 1202–1208.
41. Turner, R.J. Selenium and the immune response / R.J. Turner, J.M. Finch // *Proc. Nutr. Soc.* — 1991. — Vol. 50. — P. 275–285.

42. Urban, T. Selenium effects on human neutrophilic granulocyte function in vitro / T. Urban, C. Jarstrand // Immunopharmacol. — 1986. — Vol. 12. — P. 167–172.
43. Zhang, L. Potential interventions for novel coronavirus in China: A systematic review / L. Zhang, L. Yunhui // J. Medical Virology. — 2020. — Vol. 92. — P. 479–490.
44. Zhang, J. Association between regional selenium status and reported outcome of COVID-19 cases in China / J. Zhang, E. Taylor, K. Bennett // American J. Clinical Nutrition. — 2020. — Vol. 111, iss. 6. — P. 1297–1299.
45. Zhao, L. Molecular modeling and in vitro activity of an HIV-1-encoded glutathione peroxidase / L. Zhao, A.G. Cox, J.A. Ruzicka // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, № 12. — P. 6356–6361.
46. Zinc and human health: an update / C.T. Chasapis [et al.] // Archives of Toxicology. — 2012. — Vol. 86, № 4. — P. 521–534.
47. Xueting Y. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) / Xueting Yao, Fei Ye, Miamo Zhang // Clin. Infect. Dis. — 2020. — Vol. 71, № 15. — P. 732–739.

THE ROLE OF SELENIUM AND ZINC IN THE CORRECTION OF CERTAIN VIRAL PATHOLOGIES

Ermakov V.V.¹, Jovanovic L.N.², Moyseenok A.G.³

¹V.I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Moscow, Russia;

²ALFA BK University, Belgrad, Serbia;

*³Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds,
NAS of Belarus, Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *A brief review of the literature is devoted to a new direction in biogeochemistry and geochemical ecology — the relationship of the microcosm (viruses) with the manifestations of animal and human pathologies. Some aspects of the biological action of selenium and zinc and their influence on viral infections are considered. The mixed results in the correction of pathologies are discussed.*

АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА: ОТ ГИСТОХИМИИ К ПАТОГЕНЕЗУ АЛКОГОЛИЗМА

Зиматкин С.М.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. В обзоре обобщены собственные данные о региональном и клеточном распределении альдегиддегидрогеназы (АльДГ), основного фермента, окисляющего альдегиды в мозге, как биогенные, так и ацетальдегид (АА), образующийся при окислении этанола. АльДГ, защищая структуры мозга от повреждающего действия АА, определяет структуроспецифическое действие алкоголя в мозге, участвует в механизмах поведенческой устойчивости и влечения к алкоголю.

Введение. Альдегиддегидрогеназы (АльДГ) мозга являются основными ферментами, окисляющими альдегиды в мозге и обеспечивающими поддержание их оптимальных концентраций в структурах мозга. Значение АльДГ в естественных условиях определяется высокой биологической активностью и регуляторными свойствами альдегидов в мозге. Кроме того, эти ферменты играют ключевую роль в патогенезе заболеваний, сопровождающихся накоплением или недостаточностью этих соединений в мозге [10].

В период работы в Институте биохимии НАН Беларуси нами был разработан гистохимический метод исследования АльДГ в мозге, позволяющий получать четкую картину распределения АльДГ в ЦНС на клеточном уровне и количественно оценивать активность и субстратную специфичность фермента. Учитывая важнейшее значение альдегидов для нервной ткани и то, что АльДГ является основным ферментом, окисляющим эти соединения в ЦНС, предлагаемый метод представляет интерес для понимания регионального и клеточного распределений этих ферментов в мозге и изучения последствий различных экспериментальных воздействий и патологических состояний, меняющих метаболизм альдегидов мозга, особенно при выяснении механизмов устойчивости и влечения к алкоголю, играющих ключевую роль в патогенезе алкоголизма. Поскольку выявление активности АльДГ позволяет исследовать микрососудистое русло, нервные клетки и окончания, а также различные типы глиальных клеток, она, наряду с другими гистологическими методами, может быть применена для решения многих задач топографической, функциональной и патологической нейроморфологии [10].

С помощью разработанного нами гистохимического метода установлено, что АльДГ в ЦНС имеют множественную локализацию, а топографическое распределение их активности в сотнях микроструктур и типах клеток мозга носит закономерный характер. Среди нейронных структур наиболее высокая активность АльДГ по отношению к ацетальдегиду обнаружена в перикарионах рецепторных (1000–1300 нМформаза/мин/см³ ткани, ед.) и эффекторных (500–800 ед.) нейронов мозга, в промежуточных нейронах она значительно ниже (100–300 ед.). В нейропиле она максимальна в области окончаний рецепторных нейронов (200–500 ед.), а в белом веществе — в проводящих путях, образованных аксонами эффекторных и рецепторных нейронов (90–130 ед.) [3, 14]. Иммуногистохимическое исследование также показало неравномерное топографическое распределение в структурах мозга крысы белка высокоаффинной митохондриальной АльДГ [9, 12].

Значительная гетерогенность распределения АльДГ определяет, наряду с другими факторами, неодинаковую устойчивость разных типов нейронов и их компонентов в мозге к токсическому метаболиту этанола — ацетальдегиду (АА), а также другим, часто токсичным биогенным альдегидам, образование которых усиливается под действием алкоголя, например при усилении перекисного окисления липидов.

При этом обнаружена прямая связь активности АльДГ с «филогенетическим (эволюционным) возрастом» структур ЦНС. Активность фермента убывает в рядах: древняя — старая — промежуточная — новая кора мозга; нервные и глиальные клетки спинного и заднего мозга — промежуточного — конечного мозга. В зрительных буграх более высокой альдегиддегидрогеназной активностью обладают древние ядра передней и медиальных групп, а в коре мозжечка — отделы с большим филогенетическим возрастом [10, 14].

Корреляционный анализ наших данных о топографическом распределении АльДГ с имеющимися в литературе данными о топографическом распределении ферментов и метаболитов, связанных с обменом биогенных альдегдов показал, что АльДГ мозга пространственно сопряжена с дофаминергическими терминалями, моноаминоксидазой, НАДН-дегидрогеназой и областями интенсивного захвата ^{14}C -дезоксиглюкозы, т. е. с зонами повышенного образования биогенных альдегидов различного происхождения, подлежащих дальнейшему окислению [3, 10, 14].

Среди глиальных структур ЦНС максимальная активность АльДГ выявляется в эпендимоцитах сосудистых сплетений (1200–1300 ед.), высокая — в эпендимоцитах, выстилающих желудочки мозга и образующих циркумвентрикулярные органы (600–1100 ед.), средняя — в олигодендроцитах и астроцитах (200–500 ед.), а также в эндотелии капилляров различных областей мозга (150–250 ед.). Это прямо указывает на существование нескольких метаболических барьеров для альдегидов: между кровью, ликвором, интерстициальной жидкостью мозга и нервными клетками, ограничивающих проникновение этих соединений в мозг и взаимодействие с нейронами [1].

Активность и субстратная специфичность АльДГ нейронных и барьерных структур ЦНС в онтогенезе имеет определенную динамику, связанную по времени с естественными возрастными изменениями метаболизма и устойчивостью мозга к экзогенному этанолу (ацетальдегиду) [6]. Обнаруженная пониженная ацетальдегидокисляющая способность барьерных и нейронных структур мозга ЦНС в раннем онтогенезе может объяснять причину низкой устойчивости развивающегося мозга к алкоголю (ацетальдегиду) и развития алкогольного синдрома плода.

Характер топографического распределения АльДГ в нейронных и барьерных структурах мозга обеспечивает ее участие в механизмах, контролирующих поведенческую устойчивость (толерантность) к алкоголю. Вероятно, АльДГ, защищая функционально важные структуры мозга от повреждающего действия альдегидов, может обеспечивать, наряду с другими факторами, врожденную и приобретенную поведенческую устойчивость (толерантность) животных к алкоголю [7, 8, 10, 13, 15]. Сравнительный анализ и показал, что активность АльДГ в отношении АА выше в функционально важных структурах мозга крыс с врожденной устойчивостью к этанолу [7, 13, 15]. Животные, отличающиеся врожденным влечением к алкоголю, также значительно отличаются по активности и субстратной специфичности АльДГ во многих структурах ЦНС, особенно в пейсмекерных нейронах «центра жажды» латерального гипоталамуса, участвующих в формировании алкогольной мотивации [8, 10, 15].

Обнаружена разнонаправленная во времени реакция АльДГ мозга на алкоголь [2]. Однократное введение этанола (3,5 г/кг) первоначально (через час) избирательно угнетает активность АльДГ в капиллярах и нейронах теменной коры мозга, что может быть обусловлено,

в частности, стрессогенным действием алкоголя [4]. В более поздние сроки (6 часов) и при хроническом введении алкоголя наблюдается значительная адаптационная активация АльДГ, особенно в изначально наименее устойчивых к этанолу структурах ЦНС [2]. Установленное избирательное угнетение АльДГ в капиллярах и нейронах теменной коры в ранний период после острого введения этанола дает дополнительное объяснение низкой устойчивости новой коры мозга к токсическому действию алкоголя. Активация фермента в отдаленные сроки и при хроническом введении этанола может рассматриваться как один из механизмов приобретенной устойчивости к алкоголю и пластичности нервной системы.

Данные об угнетении АльДГ структур мозга при остром стрессе могут иметь значение для понимания причин повреждения мозга при этом воздействии и повышенной стрессочувствительности крыс, предпочитающих этанол [4].

Экзогенные этанол и АА вызывают более значительные структурные нарушения в теменной коре на фоне угнетения АльДГ. Это подтверждает важную роль данных ферментов в защите мозга от алкогольных (альдегидных) повреждений и указывает на повышенную опасность для ЦНС воздействия спиртов и альдегидов на фоне действия ингибиторов АльДГ, в том числе и при аверсивной терапии алкоголизма с использованием дисульфирама и цианамида [5, 10]. Данные о потенцировании ингибиторами АльДГ морфо-функциональных нарушений в теменной коре мозга крыс, вызываемых этанолом и АА, свидетельствуют о важной роли данного фермента в защите мозга от алкогольных (альдегидных) повреждений. Это указывает на особую опасность для мозга воздействия спиртов и альдегидов на фоне АльДГ, а также объясняет неблагоприятные последствия для ЦНС сочетанного применения этанола и ингибиторов АльДГ при аверсивной терапии алкоголизма. Полученные данные могут быть использованы для обоснования отказа от применения в клинике такого метода лечения алкоголизма, выработке противопоказаний для применения лекарственных препаратов, являющихся ингибиторами АльДГ, рекомендаций по охране труда работников промышленных производств, контактирующих со спиртами, альдегидами, ингибиторами АльДГ, либо их сочетаниями [5, 10].

Аntenатальное воздействие алкоголя приводит к значительным нарушениям развития АльДГ мозга. В дозе 4 г/кг/сутки этанол вызывает резкую избирательную активацию АльДГ в отношении АА в структурах ЦНС в ранние сроки постнатального развития (2 и 15 дней); к двум месяцам после рождения активность фермента, напротив, становится ниже нормы, а в отдаленные сроки (к 5 месяцам) нейрохимические нарушения постепенно исчезают. Нейропептид «субстанция Р» ускоряет нормализацию АльДГ мозга таких животных [11]. Полученные данные об изменениях АльДГ и других дегидрогеназ структур мозга после антенатальной алкоголизации различной интенсивности дополняют сведения о последствиях для ЦНС воздействия алкоголя в период внутриутробного развития. Избирательное корригирующее действие субстанции Р в отношении АльДГ мозга может быть использовано при разработке комплекса медикаментозных средств для лечения алкогольного синдрома плода.

Таким образом, на основании совокупности полученных данных создано новое представление об АльДГ мозга. Ее пространственная организация, связи с филогенетическим возрастом, метаболизмом и функциями структур ЦНС, индивидуальные, возрастные и линейные особенности и адаптационные изменения во многом определяют участие морфофункциональных систем ЦНС в центральных механизмах устойчивости и влечения к алкоголю, что должно учитываться при профилактике и лечении алкоголизма.

Принимая во внимание высокую биологическую активность и токсичность альдегидов, можно полагать, что физиологическая роль АльДГ связана с поддержанием оптимального уров-

ня этих эндогенных соединений в структурах мозга, а следовательно, и с обеспечением метаболического гомеостаза последних. Это может осуществляться несколькими путями: 1) АльДГ барьерных структур ограничивают проникновение данных соединений в мозг; 2) АльДГ нейронных структур регулируют локальный уровень альдегидов; 3) через изменения метаболизма и функций холин- и аминергических систем мозга АльДГ могут участвовать в механизмах запуска и поддержания влечения к алкоголю, обеспечивающего потребление этанола и, соответственно, изменения (оптимизацию) концентраций альдегидов в функционально важных структурах мозга [8, 10].

Заключение. АльДГ мозга имеет закономерную пространственную организацию, связанную с особенностями метаболизма, функциями и филогенетическим возрастом структур ЦНС. Высокая гетерогенность распределения активности АльДГ объясняет различную реакцию морфологических образований мозга на этанол (АА) — структуроспецифическое действие алкоголя в мозге.

АльДГ глиальных клеток и эндотелия кровеносных капилляров образует несколько метаболических барьеров для альдегидов: между кровью, ликвором, интерстициальной жидкостью и нервными клетками, ограничивающими проникновение этих соединений из крови в мозг и обеспечивающими независимость альдегидных пулов мозга и периферии.

АльДГ, защищая мозг от повреждающего действия альдегидов, обеспечивает, наряду с другими факторами, врожденную и приобретенную поведенческую устойчивость (толерантность) животных к алкоголю.

АльДГ структур мозга связана с влечением к алкоголю — метаболическому предшественнику АА и инициатору накопления биогенных альдегидов в ЦНС.

Учитывая все изложенное выше, морфофункциональное исследование АльДГ мозга и ее роли в механизмах устойчивости и влечения к алкоголю является новым перспективным направлением в наркологии, функциональной нейроморфологии и биохимии мозга. С одной стороны, оно позволяет с морфо-функциональных позиций рассматривать проблему патогенеза алкоголизма, а с другой — открывает возможности исследования пространственной организации альдегидного метаболизма ЦНС, его связей с функциями морфологических образований мозга, поведением животных и пластичностью нервной системы.

Список литературы

1. Зиматкин, С.М. Активность альдегиддегидрогеназы в барьерных структурах мозга / С. М. Зиматкин, Ю. М. Островский // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1988. — № 9. — С. 183–184.
2. Зиматкин, С.М. Альдегиддегидрогеназа мозга крыс при остром введении этанола / С.М. Зиматкин, Л. Е. Лис // Фармакол. и токсикол. — 1988. — № 6. — С. 92–94.
3. Зиматкин, С.М. Активность альдегиддегидрогеназы в нейронных структурах мозга крысы / С. М. Зиматкин // Арх. анат., гистол. и эмбриол. — 1989. — № 1. — С. 35–40.
4. Зиматкин, С.М. Альдегидметаболизирующая система мозга крыс с различной алкогольной мотивацией в условиях острого стресса / С.М. Зиматкин, П.С. Пронько, Ю.А. Тарасов // Нейрохимия. — 1989. — № 2. — С. 269–272.
5. Зиматкин, С.М. Структурные изменения в коре мозга крыс, вызываемые алкоголем в сочетании с ингибиторами альдегиддегидрогеназы / С.М. Зиматкин // Арх. анат., гистол. и эмбриол. — 1989. — № 10. — С. 13–20.
6. Зиматкин, С.М. Активность альдегиддегидрогеназы мозга крысы в онтогенезе / С.М. Зиматкин, Р. Е. Лис // Арх. анат., гистол. и эмбриол. — 1990. — № 5. — С. 27–33.

7. Зиматкин, С.М. Особенности альдегидокисляющей системы мозга крыс, различающихся устойчивостью к алкоголю / С.М. Зиматкин, К.О. Линдрос // Вопросы наркологии. — 1990. — № 3. — С. 20–23.
8. Зиматкин, С.М. Альдегиддегидрогеназная система мозга: связь с устойчивостью и влечением к алкоголю / С.М. Зиматкин // Успехи совр. биол. — 1991. — Т. 52, № 5. — С. 654–666.
9. Зиматкин, С.М. Регионарное и клеточное распределение митохондриальной высокоаффинной альдегиддегидрогеназы в мозге крыс / С.М. Зиматкин, Ю.Г. Карпук // Морфология. — 1994. — Т. 106, № 4–6. — С. 83–91.
10. Зиматкин, С.М. Альдегиддегидрогеназы мозга и их роль в патогенезе алкоголизма / С. М. Зиматкин. — Гродно: ГрГМУ, 2008. — 308 с.
11. Зиматкин, С.М. Уплыў антэнатальнай алкагалізацыі на альдэгідакисляльную актыўнасць мозгу і функцыю кары наднырачнікаў пацукоў / С.М. Зиматкин, Р.Я. Ліс, Ю.А. Тарасаў // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. — 1989. — № 2. — С. 89–92.
12. Regional distribution of low-K_m mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat central nervous system / S.M. Zimatkin [et al.] // Alcohol. Clin. Exp. Res. — 1992. — Vol. 16, № 6. — P. 1162–1167.
13. Zimatkin, S.M. A histochemical study of the distribution of aldehyde dehydrogenase activity in brain structures of rats with genetically different alcohol-related behavior / S.M. Zimatkin, K.O. Lindros // Alcohol. — 1989. — Vol. 6. — P. 321–325.
14. Zimatkin, S.M. Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in rat CNS / S.M. Zimatkin // J. Neurochem. — 1991. — Vol. 56. — P. 1–11.
15. Zimatkin, S.M. Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol / S.M. Zimatkin, R.A. Deitrich // Alcohol Clin. Exp. Res. — 1995. — Vol. 19. — P. 1300–1306.

BRAIN ALDEHYDE DEHYDROGENASES: FROM HISTOCHEMISTRY TO THE PATHOGENESIS OF ALCOHOLISM

Zimatkin S.M.

*Grodno State Medical University, Grodno,
Republic of Belarus*

Summary. *The review summarizes our own data on the regional and cellular distribution of aldehyde dehydrogenase (ALDH), the main enzyme that oxidizes aldehydes in the brain, both biogenic and acetaldehyde (AA) formed during the oxidation of ethanol. ALDH, while protecting the brain structures from the damaging action of AA, determines the structure-specific action of alcohol in the brain and participates in the mechanisms of behavioral tolerance and craving for alcohol.*

АНТИВИТАМИННАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ТИАМИНА

Зиматкина Т.И.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. В обзоре представлены результаты проведенных нами исследований по оценке антивитаминовой активности четырех групп новых производных тиамина. Изучены особенности ингибирования данными соединениями основных тиаминзависимых ферментов в различных органах и тканях экспериментальных животных и обсуждены возможные молекулярные механизмы их действия.

Витамины и их производные, являясь активными регуляторами метаболических процессов в организме, широко используются в экспериментальной практике для направленной регуляции отдельных звеньев обмена веществ, а также при лечении ряда заболеваний человека и животных. Витамин В₁ (тиамин) играет важную роль в организме в метаболизме глюкозы и энергетическом обмене, биосинтезе рибозо-5-фосфата (структурный компонент нуклеиновых кислот) [3]. Имеются данные о взаимосвязи обеспеченности организма тиаминном и ростом перевиваемых опухолей [5, 6, 7], а также о наличии выраженных канцеростатических и противоопухолевых свойств у его химических аналогов с антивитаминными свойствами [1, 2, 4].

В связи с ключевыми позициями в обмене веществ ТДФ-зависимых (тиаминдифосфат) ферментов [3] и установленной их важной ролью в патогенезе ряда заболеваний, в частности, транскетолазы (ТК) при злокачественном росте [4, 5, 6], была высказана гипотеза о перспективности дальнейшего поиска более эффективных регуляторов активности тиаминовых ферментов среди различных новых синтетических аналогов витамина В₁, отражающих неизученные ранее типы модификации его молекулы [1]. В этой связи следует подчеркнуть целесообразность разработки и исследования производных тиамина с антиметаболитным механизмом действия. Представляя собой близкие по химической структуре к витамину В₁ вещества, они способны тормозить или полностью блокировать в органах и тканях соответствующие тиаминзависимые реакции [3].

На основании критического анализа представленных в литературе данных нами была сформулирована концепция целенаправленного поиска новых биологически активных производных тиамина [1]. При этом особый акцент был сделан на достижение повышенной избирательности их антиметаболитного действия и снижение побочных эффектов. Знание основных атомов и группировок в молекуле витамина В₁, ответственных за процесс его фосфорилирования в организме (образование коферментной формы), а также важных для самого акта тиаминового катализа или взаимодействия с апоферментными белками основных ТДФ-зависимых ферментов дало нам возможность провести отбор перспективных производных тиамина с потенциальными антивитаминными свойствами среди различных новых соединений, синтезированных в Институте биохимии НАН Беларуси и НИИ физико-химических проблем БГУ под руководством академика Ю.М. Островского, академика Ф.Н. Капуцкого и доктора химических наук Д.А. Опарина и высказать предположение о молекулярных механизмах их действия.

В период с 90-х годов прошлого века и по настоящее время нами проведены исследования по изучению влияния разных типов химической модификации молекулы витамина В₁ на различные биологические эффекты его производных.

В зависимости от особенностей химической структуры все исследуемые соединения были разделены нами на четыре группы, которые включали:

1-я группа — производные тиаминна с необратимой химической модификацией функциональной группы в пиримидиновом цикле (замена аминогруппы на гидроксил) и различными вариантами обратимой модификации функциональных групп или атомов в тиазоловом компоненте (различные соли по четвертичному атому азота, сложные эфиры с одноосновными и дикарбоновыми кислотами по 5-оксиэтильному радикалу, серии несимметричных дисульфидов с нормальными и разветвленными углеводородными радикалами, сложные эфиры и моносульфоксид симметричного дисульфида по атому серы);

2-я группа — химические аналоги витамина В₁ с необратимыми модификациями функциональной группы в пиримидиновом (замена аминогруппы на гидроксил) и тиазоловом (тиоэфиры по атому серы) циклах;

3-я группа — производные тиаминна с модификациями углеродного скелета его молекулы (трициклические аналоги витамина В₁ — фосфорнокислые и сложные эфиры тиохрома, оксодигидротиохром и его фосфорнокислые эфиры, оксотиохром);

4-я группа — химические аналоги витамина В₁ с необратимой глубокой модификацией углеродного скелета его молекулы (замена тиазолового цикла на тиадиазиновый, сложные эфиры тиадиазинового производного тиаминна).

Предполагалось, что для различных латентных форм гидроксированного по пиримидину аналога витамина В₁ — окситиаминна (ОТ) (1-я группа) и тиохромдифосфата (3-я группа) будет характерен антикоферментный механизм действия и чисто конкурентный, по отношению к ТДФ, тип ингибирования тиаминных ферментов, поскольку эти производные будут сохранять тот же характер взаимосвязи с ферментными белками, что и исходные соединения. При этом в качестве «ложного» реагента везде будет выступать тиохромдифосфат или ОТ-дифосфат, образующийся при диссоциации солей, гидролизе сложных эфиров, расщеплении дисульфидов с последующей тиолизацией.

Различия в антивитаминовых свойствах данных соединений будут в основном обусловлены изменением их физико-химических свойств, что скажется на всасываемости, проницаемости через клеточные мембраны, распределении и депонировании в организме, а также на скорости ретрансформации этих модифицированных производных в свободный ОТ или тиохромдифосфат. Из-за более сильного сродства ОТ-дифосфата к ТК (КФ 2.2.1.1) по сравнению с истинным коферментом соединения 1-й группы могут проявлять повышенную избирательность ингибирующего действия в отношении данного фермента, а тиохромтрифосфат (3-я группа) — к пируватдегидрогеназе (ПДГ, КФ 1.2.4.1) в связи с наличием выраженных антикоферментных свойств в опытах *in vitro* в отношении этого ТДФ-зависимого фермента у тиохромдифосфата.

Антагонисты витамина В₁ нейротропного действия, в частности, эффективные конкурентные ингибиторы ТК в мозге, могут быть обнаружены среди более липофильных производных ОТ (1-я группа), полученных на основе его циклической (сложные эфиры) или открытой (несимметричные дисульфиды) форм.

Трициклические аналоги витамина В₁, являющиеся продуктами окисления тиохрома (3-я группа), могут значительно угнетать в опытах *in vivo* активность различных тиаминных ферментов и проявлять смешанный по отношению к ТДФ тип ингибирования в связи с возмож-

ностью их непосредственного воздействия как на каталитический, так и на адсорбционный центры ферментов. Данным соединениям из-за значительных различий в химической структуре может быть присущ, наряду с некоферментными свойствами, коферментный механизм действия, поскольку они способны трансформироваться в дальнейшем в организме в близкие структурные аналоги тиамин оксотиамин и его фосфаты, которые, вероятно, могут выступать в качестве специфических ингибиторов по схеме, аналогичной для традиционных антиметаболитов тиамин.

Производные витамина В₁ с видоизмененным углеродным скелетом молекулы, имеющие необратимую модификацию нескольких функциональных групп и атомов (2-я группа) или всего тиазолового цикла (4-я группа), будут менее значительно по сравнению с соединениями 1-й и 3-й групп в силу более глубоких различий в химической структуре угнетать активность тиаминных ферментов в органах и тканях и проявлять некоферментный механизм действия.

Проведенный нами в опытах на интактных животных (белых мышах и крысах) комплекс исследований по изучению авитаминовых свойств новых производных витамина В₁ полностью подтвердил правильность высказанной нами гипотезы и предложенной концепции [1].

Установлено, что соединения 1-й группы проявляют повышенную избирательность действия в отношении ТК и угнетают ее активность по конкурентному в отношении ТДФ типу. Сильные ингибиторы данного фермента с пролонгированными свойствами найдены среди асимметричных дисульфидов ОТ с нормальными и разветвленными углеводородными радикалами, симметричных О-ацилдисульфидов, полных эфиров с некоторыми дикарбоновыми кислотами. Эти производные имеют значительные преимущества по сравнению с исходным соединением при транспорте и депонировании в организме. Наилучшие результаты получены в случае использования солевых форм ОТ — различных полиангидроглюкуронатов, применение которых позволяет увеличить срок ингибирования ТК в органах и тканях экспериментальных животных на 60 % по сравнению с исходным соединением. Тиохромтрифосфат проявляет выраженное избирательное действие в отношении ПДГ. Молекулярный механизм действия этого производного аналогичен соединениям 1-й группы.

Эффективные антагонисты витамина В₁ нейротропного действия обнаружены среди сложных эфиров ОТ с замещенными индолил-, фталил-, дигидрофурилуксусной, аминопропионовой, аминифенилмасляной и никотиновой кислотами. Данные соединения позволяют контролируемо изменять активность ТК в мозге подопытных животных и являются удобным инструментом для исследования и регуляции отдельных ТДФ-зависимых реакций в нервной ткани.

Трициклические аналоги тиамин, являющиеся продуктами окисления тиохрома (3-я группа), оказывают в опытах *in vivo* выраженное ингибирующее действие на ТК и ПДГ и не изменяют активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ, КФ 1.2.4.2). Авитаминовый эффект этих соединений проявляется при меньших дозах и в более ранние сроки, что отличает их от всех известных в настоящее время ингибиторов ТДФ-зависимых ферментов. Данные производные угнетают активность дрожжевой пируватдекарбоксилазы по смешанному типу. В механизме их действия сочетаются коферментные и некоферментные свойства. Это по существу новая группа антагонистов витамина В₁, представляющая значительный интерес в теоретическом и практическом планах для экспериментальных исследований в области биохимии витаминов.

Производные тиамин с глубокой модификацией углеродного скелета молекулы (2-й и 4-й групп) в меньшей степени угнетают активность тиаминных ферментов в органах и тканях животных и проявляют некоферментный механизм действия.

Таким образом, в результате проведенных нами исследований выявлены эффективные регуляторы активности тиаминзависимых ферментов в органах и тканях экспериментальных

животных, в том числе с высокой ингибирующей активностью и селективностью действия, среди не изученных ранее химических аналогов витамина В₁ и обсуждены возможные молекулярные механизмы их действия. Получена новая информация о взаимосвязи биологической активности и химической структуры соединений, которая важна для дальнейшего целенаправленного синтеза новых веществ с заданными свойствами.

Практическая значимость результатов исследования заключается в получении новых тонких инструментов для направленной регуляции обменных процессов в различных органах и тканях и возможности успешного применения их в экспериментальной витаминологической практике для моделирования В₁-, гипо- и авитаминозных состояний и изучения на этом фоне механизмов и роли отдельных тиаминзависимых реакций в обмене веществ, строения активных центров ферментов, катализирующих данные реакции, а также для создания и тестирования новых витаминных препаратов, исследования особенностей действия на организм тиаминовой недостаточности и ее комбинаций с другими вредными для здоровья факторами окружающей среды.

Список литературы

1. Зиматкина, Т.И. Биологическая активность новых производных тиаминна / Т.И. Зиматкина, С.М. Зиматкин. — Гродно: ГрГМУ, 2008. — 200 с.
2. Островский, Ю.М. Антивитамины в экспериментальной и лечебной практике / Ю.М. Островский. — Минск: Наука и техника, 1973. — 173 с.
3. Островский, Ю.М. Активные центры и группировки в молекуле тиаминна / Ю.М. Островский. — Минск: Наука и техника, 1975. — 421 с.
4. Boros, L.G. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation / L.G. Boros, J. Puigjaner, M. Cascante // Cancer research. — 1997. — Vol. 57. — P. 4242–4248.
5. Cascante, M. Role of thiamine (vitamin B₁) and transketolase in tumor cell proliferation / M. Cascante, J.J. Centelles, R.L. Veech // Nutr. Cancer. — 2000. — Vol. 36, № 2. — P. 150–154.
6. Kim, S. Bioinformatic and metabolomic analysis reveals miR-155 regulates thiamine level in breast cancer / S. Kim, J.K. Rhee, H.J. Yoo // Cancer Lett. — 2015. — Vol. 357. — P. 488–497.
7. Zastre, J.A. Linking vitamin B₁ with cancer cell metabolism / J.A. Zastre, R.L. Sweet, B.S. Hanberry // Cancer Metabolism. — 2013. — Vol. 1. — P. 16–23.

ANTIVITAMIN ACTIVITY OF THIAMINE DERIVATIVES

Zimatkina T. I.

*Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The review presents the results of our research to assess the anti-vitamin activity of four groups of new thiamine derivatives. The features of inhibition of the main thiamine-dependent enzymes by these compounds in various organs and tissues of experimental animals were studied and possible molecular mechanisms of their action were discussed.*

СТРЕСС-ЛИМИТИРУЮЩИЕ И СТРЕСС-РЕАЛИЗУЮЩИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА

*Зинчук В.В., Балбатун О.А., Гуляй И.Э., Глуткин С.В., Жадько Д.Д.,
Орехов С.Д., Лепеев В.О., Борисова В.Ю., Игнатович А.А., Машкова А.Е.*

*Учреждение образование «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Изучено влияние хронофизиологической организации, системы газатрансмиттеров, кислородзависимых процессов на стресс-лимитирующие и стресс-реализующие механизмы адаптации в организме.

Введение. Организм подвержен действию экстремальных факторов среды: неблагоприятные климатические условия среды, большие психические и физические нагрузки и др. Длительность воздействия и интенсивность стрессоров влияет на формирование стресс-лимитирующих и стресс-реализующих механизмов адаптации организма, определяя его функциональные резервы. Чрезмерный по интенсивности и длительности стресс-синдром из звена адаптации трансформируется в фактор патогенеза, что играет решающую роль в возникновении различных патологий, профилактика и терапия которых составляют главную проблему медицины [6].

Суточная потребность во сне у студентов в среднем составляет 8,5 ч. Обучение в вузе сопровождается сокращением длительности ночного сна [5]. Особенно часто дефицит сна выявляется у студентов, изучающих медицинские науки [12]. Нами изучена взаимосвязь между хронотипом, характером организации сна и тонусом вегетативной нервной системы у студентов младших курсов медицинского вуза. В исследовании приняли участие 311 студентов обоего пола 2–4 курсов учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» в возрасте от 19 до 25 лет. Тип суточной организации биоритмов определяли с помощью опросника Хорна-Остберга с выделением групп утреннего ($n = 57$), вечернего ($n = 83$) и аритмичного ($n = 171$) хронотипов. Путем анонимного анкетирования проводили оценку качества сна с помощью Питтсбургского индекса качества сна (Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI) до поступления в вуз и при обучении в рабочие дни, в выходные дни и во время каникул. Тонус ВНС оценивали при помощи вегетативного индекса Кердо (ВИК).

Измеряли длительность индивидуальной минуты по Н.И. Моисеевой [7]. У 95 % белорусских студентов длительность индивидуальной минуты находилась в пределах нормы, что свидетельствует об отсутствии десинхроноза у большинства испытуемых. Продолжительность ночного сна в рабочие дни до поступления в вуз была больше 8 (7–9) ч, по сравнению с обучением в вузе 7 (6–8) ч, $p < 0,05$. Аналогично сократилась длительность ночного сна в выходные дни: 10 (8–11) и 9 (8–10) ч, $p < 0,05$, соответственно. При обучении в вузе спят днем ежедневно 20 % студентов, 1–4 раза в неделю — 70 %. Субъективно испытывают дефицит сна: 4% — никогда, 38 % — периодически, 42 % — часто, 18 % — постоянно. Студенты просыпаются во время ночного сна 1 (1–2) раза в неделю, имеют жалобы на проблемы со сном в связи с кашлем или громким храпом: 1 (0–1) пробуждений в неделю, отмечают случаи кошмарных сновиде-

ний — 1 (1–2) в неделю. 76 % студентов отмечают наличие от 1 до 3 и более приступов сонливости в течение каждой недели на протяжении месяца перед опросом. При сокращении длительности ночного сна наблюдается увеличение количества нарушений ночного сна в виде частых пробуждений и кошмарных сновидений ($R = -0,3964$, $p = 0,0354$).

После учебной нагрузки регулярный дневной сон наблюдается у 20 % студентов утреннего хронотипа, 50 % — аритмичного и 90 % — вечернего хронотипа. Средняя продолжительность дневного сна у студентов вечернего хронотипа больше (3 (3–4) ч, $p < 0,05$) по сравнению со студентами утреннего хронотипа (0 (0–1,5) ч). Субъективное ощущение дефицита сна наблюдается у 10 % студентов утреннего хронотипа, 25 % — аритмичного и 80 % — вечернего хронотипа. У 91 % студентов значения ВИК находились в пределах нормы. Показатели ВИК составили +9,5 (0,5 – [+12,3]) у утреннего, –10,9 (–7,6 – [–12,8]) у аритмичного и –2,8 (–7,4 – [+4,3]) у вечернего хронотипов. Таким образом, наблюдается тенденция к увеличению тонуса симпатической нервной системы у студентов утреннего хронотипа.

У подавляющего большинства студентов не смотря на сокращение длительности ночного сна отсутствует десинхроноз. Это можно объяснить высокими компенсаторными возможностями молодого организма. Студенты утреннего хронотипа характеризуются минимальными жалобами на расстройство ночного сна и низкой длительностью дневного сна. Вечерний хронотип характеризуется значительным количеством предъявляемых жалоб на качество сна, высокой длительностью дневного сна. Результаты исследования подтверждают целесообразность проведения профилактических мероприятий по улучшению качества сна у студентов медицинского университета. Наиболее актуальны мероприятия по нормализации сна у студентов вечернего хронотипа.

Антропометрические параметры и факторы, включенные в определение метаболического синдрома, хотя и не являются некоррелированными, могут синергически функционировать в качестве предикторов риска смертности, потенциально улучшая индивидуальную оценку риска по сравнению с использованием любого набора предикторов в изоляции [10].

В доступной литературе не обнаружено сравнения индекса формы тела (ИФТ) в Беларуси с данными выборки Соединенных Штатов Америки. Стандартизация данных индекса на белорусской популяции также не проводилась. Мы проанализировали распределение ИФТ у здоровых испытуемых Беларуси и сравнили полученные данные с результатами по США. У 460 молодых людей (342 девушек и 118 юношей в возрасте от 18 до 19 лет) проведено измерение массы (P , кг), длины тела (H , м) и окружности талии (OT , м). Вычислены индекс массы тела: $ИМТ = P/H^2$, индекс формы тела: $ИФТ = OT/ИМТ^{2/3} \cdot H^{1/2}$. У части испытуемых также оценен состав тела при помощи анализатора жировой массы Tanita BC-582 (86 девушек и 44 юношей). У девушек среднее значение ИФТ составило 0,069, а стандартное отклонение — 0,004, что достоверно отличалось от соответствующего значения для данного возраста по данным [9] в США — 0,078 и 0,004 ($P = 0,000$). Юноши также имели меньшие значения ИФТ (0,075 и 0,005) по сравнению со сверстниками США (0,077 и 0,004) ($P = 0,002$). Следовательно, 92 % наших девушек и 45 % юношей оказались по американским меркам в группе минимального риска преждевременной смерти, а 29 % юношей — высокого и очень высокого. В Индонезии, как и в нашем случае, шкалы формы тела сильнее отличались от выборки США для женщин в сравнении с мужчинами [13]. Сами разработчики индекса наблюдали такую же картину при сравнении выборок из США и Великобритании [8]. Правда, выборка в Британии была произведена в 1984–1985 годах, а в Соединенных Штатах у представителей обоих полов в выборке отмечено повышение массы тела (MT) и $ИМТ$ в зоне низких значений ИФТ. У них также отмечено «пилообразное» колеба-

ние длины тела (ДТ) при плавном изменении графика ИФТ. Все это указывает на неоднозначность ИФТ и приводит к плохим прогностическим результатам на различных выборках. При проведении корреляционного анализа на нашей выборке показаны достоверные связи ИФТ с массой тела, ОТ и ИМТ, у авторов методики ИФТ достоверно коррелирует только с ОТ.

При факторном анализе (как у девушек, так и у юношей) отмечено вхождение с высокой факторной нагрузкой в первый фактор МТ, ОТ и ИМТ; во второй — ИФТ; в третий — ДТ. У юношей отношение ОТ/МТ и ОТ/ДТ образуют четвертый фактор, в который они входят с противоположным знаком. Причем, представители обоих полов ОТ, ОТ/МТ и ОТ/ДТ с достаточно выраженной нагрузкой (от 0,22 до 0,58) входят в фактор, в котором доминирует ИФТ. Эти факторные нагрузки, как и корреляции, указывают на то, что разработчикам теста не удалось уйти от связей ИФТ с МТ и ОТ. Кроме того, у девушек индексы ОТ/МТ и ОТ/ДТ во втором факторе находятся с отрицательным знаком. Все параметры состава тела (получены на анализаторе жировой массы Tanita BC-582) при факторном анализе вошли в первый фактор с нагрузкой около 0,9 и поэтому рассматривались как зависимые от МТ показатели. В данной возрастной группе 92 % наших девушек и 45 % юношей оказались по американским меркам в группе минимального риска преждевременной смерти, а 29 % юношей — высокого и очень высокого. Следовательно, шкалы риска для ИФТ в нашей стране должны быть пересмотрены во всех возрастно-половых группах.

Перспективными направлениями стресс-модулирующей терапии является применение адаптогенов природного происхождения. Одним из таких факторов является мелатонин [11]. Он осуществляет гормональную регуляцию суточного ритма периферических органов через соответствующие рецепторы. Кроме того, обнаружены прямые связи супрахиазмальных ядер с печенью, надпочечниками и некоторыми другими периферическими органами, через которые осуществляется нервная регуляция суточного ритма периферических органов. Мелатонин обладает широким спектром действия. В частности, влияет на ряд показателей кислородзависимых процессов, протекающих в организме [2]. Для изучения роли мелатонина при остром стрессе моделировали гипоксическое состояние путем одночасового воздействия на экспериментальных животных низкой концентрацией кислорода (12–12,5 %). Предварительно до воздействия на крыс получали комбинацию препаратов: мелатонина и модуляторов L-аргинин-NO системы (L-аргинин, N^w-nitro-L-arginine) и сероводорода (гидросульфид натрия, DL-пропаргилглицин). Введение мелатонина улучшает показатели кислотно-основного состояния (КОС), снижает активность процессов перекисного окисления липидов в условиях гипоксии, что может быть связано и с участием в этих процессах сероводорода. Сочетание мелатонина с L-аргинином способствует модификации кислородтранспортной функции крови через влияние на КОС, молекулы монооксида азота и сероводорода. Комбинация мелатонина и N^w-nitro-L-arginine уменьшает сродство гемоглобина к кислороду при стандартных условиях среды, увеличивает его поступление в ткани, улучшает параметры КОС, но не нормализует их до уровня контрольной группы. Совместное введение мелатонина и ингибитора сероводорода повышает дезоксигенацию крови, приводит к избыточному выведению углекислого газа из организма и падению рСО₂, развитию газового алкалоза, что обуславливает гипокальциемию, увеличивает уровень нитрат/нитритов, указывая на содружественное участие монооксида азота с сероводородом в кислородзависимых процессах крови. Комбинация же мелатонина с гидросульфидом натрия не вызывает защелачивание крови (рН ближе к норме), способствует наименьшему дисбалансу прооксидантно-антиоксидантного состояния, увели-

чивает концентрацию Ca^{2+} в крови. Таким образом, в нашем исследовании модификация процессов транспорта кислорода влияет на образование сигнальных молекул. С одной стороны, их воздействие связано с прямым регулированием содержания O_2 в кровеносной системе или тканях и клетках, с другой — влияет на респираторный или метаболический компоненты КОС, с третьей — приводит к изменению внутриэритроцитарных механизмов, которые влияют на сродство гемоглобина к кислороду и прооксидантно-антиоксидантное состояние, с четвертой — включает компенсаторные адаптационные процессы, стресс-лимитирующие реакции.

В настоящее время представляет интерес исследование молекулярно-генетических факторов, определяющих функционирование органов и систем и регулирующих протекание физиологических процессов в организме. Доставка кислорода является результатом тесной интеграции кислородсвязывающих свойств крови и кровообращения, деятельность которых координируется большим числом геном, вовлеченных в адаптацию организма к физическим нагрузкам [4, 3]. Индивидуальные генетические особенности, обуславливающие адаптацию к гипоксическим воздействиям, могут в этом случае влиять и на уровень максимального потребления кислорода [1]. В связи с этим представляет интерес изучение молекулярно-генетических структур, ответственных за метаболизм монооксида азота — сигнальной молекулы, обеспечивающей в организме нормальное протекание значительного количества физиологических процессов. Таким образом, важно оценить значение различных полиморфных вариантов генов L-аргинин-NO системы в формировании адаптивных изменений кислородного гомеостаза. Нами было изучено распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма гена T786C эндотелиальной синтазы монооксида азота и их ассоциации с параметрами функционального состояния у здоровых лиц. В результате исследования были установлены различия функционирования сердечно-сосудистой системы с учетом полиморфизма гена T786C эндотелиальной синтазы монооксида азота, что, вероятно, вносит определенный вклад в состояние функциональных резервов и адаптационных возможностей организма человека. Можно предположить, что в условиях стресса, повышенной физической нагрузки эти различия могут быть более выражены и иметь значения для определения должного уровня функциональных резервов организма. Было выявлено распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса T786C гена эндотелиальной синтазы монооксида азота у здоровых лиц. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что изучаемый полиморфный локус T786C имеет значение для формирования эффекта на диастолическое и среднее динамическое давление, функциональные гемодинамические параметры сердечно-сосудистой системы (минутный объем крови, ударный объем, общее периферическое сопротивление сосудов). Генотип TT ассоциирован с более высокими значениями систолического, диастолического и среднего динамического давления у здоровых лиц. Таким образом, установленные нами различия в функционировании сердечно-сосудистой системы с учетом полиморфизма T786C гена эндотелиальной синтазы монооксида азота влияют на формирование функциональных резервов и адаптационных возможностей организма.

Заключение. Таким образом, можно предположить, в стресс-лимитирующих и стресс-реализующих механизмах адаптации организма могут участвовать эффекты физиологически активных веществ, природного и другого происхождения, реализующие свой вклад через хронофизиологическую организацию, геном, систему газатрансмиттеров, кислородзависимые процессы.

Список литературы

1. Бондарева, Э.А. Поиск ассоциаций G/A — полиморфизма гена EPAS1 с уровнем максимального потребления кислорода у российских спортсменов / Э.А. Бондарева, А.Н. Блеер, Е.З. Година // Физиология человека. — 2016. — Т. 42, № 3. — С. 120–124.
2. Влияние мелатонина на кислородзависимые процессы / В.В. Зинчук [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2013. — № 2. — С. 32–36.
3. Глазачев, О.С. Особенности реактивности сосудов микроциркуляторного русла практически здоровых людей при моделировании острой умеренной гипоксии и гипероксии / О.С. Глазачев, Е.И. Дудник // Физиология человека. — 2013. — Т. 39, № 4. — С. 74–81.
4. Ильютик, А.В. Алгоритм определения спортивной специализации конькобежцев на основе результатов анализа полиморфизма генов ACE, NOS3, BDKRB2, ACTN3, PPAR γ , CYP17A1 / А.В. Ильютик [и др.] // Мир спорта. — 2015. — № 4. — С. 49–55.
5. Кремнева, В.Н. Влияние сна на успеваемость студентов вуза / В.Н. Кремнева, Е.М. Солодовник // J. E-Scio. — 2019. — Т. 6, № 33. — С. 1–10.
6. Меерсон, Ф.З. Адаптационная медицина: концепция долговременной адаптации / Ф.З. Меерсон. — М.: Дело, 1993. — 138 с.
7. Моисеева, Н.И. Временная среда и биологические ритмы / Н.И. Моисеева, В.М. Сысоев. — Л.: Наука, 1981. — 128 с.
8. Krakauer, N.Y. Dynamic association of mortality hazard with body shape / N.Y. Krakauer, J.C. Krakauer // J. PLoS One. — eCollection, 2014. — Vol. 9, № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088793>.
9. Krakauer, N.Y. A new body shape index predicts mortality hazard independently of body mass index / N.Y. Krakauer, J.C. Krakauer // PLoS One. — eCollection, 2012. — Vol. 7, № 7. Published: July 18, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039504>.
10. Krakauer, N.Y. Anthropometrics, metabolic syndrome, and mortality hazard / N.Y. Krakauer, J.C. Krakauer // J. Obesity. — eCollection, 2018. — Vol. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/92419047>.
11. Phenolic melatonin-related compounds: their role as chemical protectors against oxidative stress / A. Galano et al. // Molecules — eCollection, 2016. — Vol. 21, № 11. <https://doi.org/10.3390/molecules21111442>.
12. The prevalence and association of stress with sleep quality among medical students / A.I. Almojali [et al.] // J. Epid. and Global Health. — 2017. — Vol. 7, № 3. — P. 169–174.
13. Yin, B.C. A body shape index in middle-age and older Indonesian population: scaling exponents and association with incident hypertension / B.C. Yin // PLoS One. — eCollection, 2014. — Vol. 9, № 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085421>.

STRESS-LIMITING AND STRESS-IMPLEMENTING MECHANISMS OF ADAPTATION OF THE ORGANISM

*Zinchuk V., Balbatun O., Gulyai I., Hlutkin S., Zhadko D., Arekhau S.,
Lepeev V., Borisova V., Ignatovich A., Mashkova A.*

*Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The influence of a chronophysiological organization, the gas transmitter system, and oxygen-dependent processes on stress-limiting and stress-realizing mechanisms of an adaptation in the organism was studied.*

СТРУКТУРА, ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ, АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМПЛЕКСА ВКЛЮЧЕНИЯ КВЕРЦЕТИН-HP- β -CD

Ильич Т.В.¹, Коваленя Т.А.¹, Лапшина Е.А.¹, Буко В.У.², Заводник И.Б.¹

¹Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», г. Гродно, Республика Беларусь;

²Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь

Резюме. В настоящей работе мы оценили стехиометрию, константу ассоциации и термодинамические параметры комплексообразования кверцетина с HP- β -CD, сравнили антиоксидантный потенциал флавоноида и комплекса включения в коррекции нарушений окислительно-восстановительного баланса митохондрий печени крыс при моделировании окислительного стресса *in vitro* терт-бутилгидропероксидом (700 мкМ).

Введение. Полифенолы, вторичные метаболиты высших растений, не синтезируемые в животных тканях, демонстрируют многочисленные благоприятные эффекты как *in vivo*, так и *in vitro*. Одним из наиболее изученных полифенолов является флавоноид кверцетин (3, 3', 4', 5, 7-пентагидроксифлавоноид) — представитель семейства флавоноидов, обладающий 3-гидрокси-флавоновым скелетом [1]. Кверцетин, один из компонентов диеты человека, присутствует в значительных количествах в цитрусовых, яблоках, луке, зеленом и черном чае и др., повсеместно используется в пищевой и фармацевтической промышленности, обладает противовоспалительной, антиаллергенной, антиоксидантной и противоопухолевой активностями, высоким терапевтическим потенциалом [13]. Предполагают, что антиоксидантные свойства растительных полифенолов обеспечивают благоприятное протекание важнейших физиологических процессов, определяют эффекты этих компонентов диеты при сердечно-сосудистых заболеваниях, старении, воспалительных процессах.

Фармакологическое применение кверцетина ограничено его плохой растворимостью в воде (около 1 мкг/мл) и низкой биодоступностью (усваивается только около 20 % введенного кверцетина [13]). Для специфической и безопасной доставки лекарственных средств (биоактивных молекул) к тканям и клеткам-мишеням, снижения токсичности, повышения стабильности, предотвращения деструкции разрабатываются и тестируются разнообразные транспортные системы (пищевые и непищевые). В качестве одного из наиболее перспективных пищевых инкапсулирующих полисахаридов в настоящее время рассматриваются β -циклодекстрины, которые широко используются при разработке способов направленной доставки, создании функциональных продуктов питания, детоксикации организма. Циклодекстрины представляют собой циклические водорастворимые углеводы, состоящие из 6, 7 или 8 единиц глюкопиранозы (α -, β - и γ -циклодекстрины соответственно). Использование циклодекстринов (CD) как молекулярных контейнеров доставки биологически активных веществ направлено, в первую очередь, на увеличение биологической активности включаемых молекул, повышение биодоступ-

ности и функциональности. CD обладают гидрофобной внутренней полостью и гидрофильной поверхностью и способны формировать супрамолекулярные комплексы включения с разнообразными органическими соединениями по типу «гость-хозяин». CD широко используются в медицинской, фармацевтической, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и других областях. В литературе широко представлены данные о механизмах комплексообразования кверцетина и β -CD, стехиометрии, константах стабильности комплексов включения, физико-химических и биохимических свойствах [10]. В то же время β -CD имеет ограниченную растворимость в воде (0,0185 г/мл), проявляет нефротоксичность, в связи с этим мы использовали модифицированный циклодекстрин, (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин (HP- β -CD), который значительно менее токсичен и характеризуется высокой растворимостью в воде ($> 0,45$ мг/мл). Цель настоящей работы — выяснить термодинамические параметры комплекса включения флавоноида кверцетина с HP- β -CD, формируемого с целью повышения биодоступности и фармакологической эффективности инкапсулируемого соединения, используя методы УФ-спектроскопии, изотермической микрокалориметрии смешения (ИТС), а также оценить антиоксидантный потенциал кверцетина и его комплекса с HP- β -CD.

Материалы и методы исследования. В работе использовали кверцетин (Sigma-Aldrich GmbH, Germany), гидроксипропил- β -циклодекстрин (HP- β -CD) (CycloLab Ltd, Budapest, Hungary), остальные реактивы соответствовали квалификации х.ч. («Реахим», Россия). Комплекс включения кверцетин-HP- β -CD был получен согласно методу, предложенному I.M. Savić и др. [12], суспензированием кверцетина (50 мг) и HP- β -CD (250 мг) в 96%-м этаноле (50 мл). Суспензию перемешивали на магнитной мешалке в течение 24 ч при 60 об/мин и +20 °С. Для предотвращения реакции фотодеградациии кверцетина колбу закрывали алюминиевой фольгой.

Исследование фазовой растворимости кверцетина в суспензии циклодекстрина проводили по методу Higuchi и Connors [7]. Одинаковое количество полифенола добавляли к водному раствору, содержащему HP- β -CD, в диапазоне концентраций 0–16 мМ, pH 6,8; T = 298 К. Образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 72 ч для достижения равновесия, фильтровали через бумажный фильтр, затем фильтрат центрифугировали при 13500 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Количество растворенного полифенола определяли спектрофотометрически, используя ранее построенную калибровочную кривую. Константу ассоциации (K_s) комплекса включения рассчитывали по формуле

$$K_s = \frac{\text{slope}}{S^0 * (1 - \text{slope})},$$

где S^0 — растворимость кверцетина в отсутствие циклодекстрина при +25 °С, *slope* — угол наклона фазовой диаграммы растворимости, представляющей зависимость концентрации кверцетина от концентрации HP- β -CD.

Энергетические эффекты, сопровождающие процессы образования комплексов включения по типу «гость-хозяин» определяли методом калориметрического титрования водных растворов полифенолов модифицированным циклодекстрином. Предварительно были определены тепловые эффекты разведений растворов циклодекстрина растворителем. Измерения проводили при 298,15 К, используя калориметр смешения MicroCal (США) и программное обеспечение калориметра: VPViewer 2000 (MicroCal) и Origin7 (OriginLab) [9].

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования из печени крыс [8]. Митохондриальный осадок суспендировали в среде выделения следующего состава: 150 мМ KCl, 20 мМ KH_2PO_4 , 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,4, концентрация белка — 35–40 мг/мл. Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавт. [9].

Митохондрии (12 мг белка/мл в среде выделения) экспонировали tВНР (700 мкМ) в течение 30 мин при +27 °С в отсутствие или в присутствии кверцетина или комплекса кверцетин-НР-β-CD. Количество продуктов перекисного окисления липидов, ТБК-реактивных соединений (ТБКРС), в митохондриях печени определяли после воздействия tВНР по методу Stoks и Dormandy [11], используя коэффициент экстинкции 156 мм⁻¹см⁻¹ (532 нм). Концентрацию GSH в митохондриях определяли спектрофотометрически по методу Элмана [14], используя коэффициент экстинкции 13,6 мм⁻¹ см⁻¹ (412 нм).

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием пакета программ StatSoftStatistica 6.0. Результаты представляли в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. Достоверность межгрупповых различий оценивали, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением теста Тьюки.

Результаты исследования и их обсуждение. 1. *Оценка термодинамических параметров комплексообразования кверцетина и НР-β-CD методом УФ-спектроскопии, ИТС.* На начальном этапе оценки параметров комплексообразования кверцетина и НР-β-CD мы определили молярный коэффициент экстинкции (ε) кверцетина в водном растворе, измеряя зависимость оптической плотности (УФ) водных растворов кверцетина от его концентрации (0–1 × 10⁻⁴ моль/л) при λ_{max} = 377 нм. Зависимость описывается уравнением $y = 3940x + 0,0011$ ($R^2 = 0,999$), что соответствует молярному коэффициенту экстинкции флавоноида ε = 3940 М⁻¹см⁻¹ при λ_{max} = 377 нм.

Далее мы оценили растворимость кверцетина в присутствии различных концентраций НР-β-CD (0–16 мМ). Зависимость концентрации растворенного лиганда (кверцетина) от концентрации внесенного циклодекстрина (фазовая диаграмма растворимости) описывается линейным уравнением $y = 0,008x \pm 7 \times 10^{-7}$ ($R^2 = 0,9928$). Растворимость кверцетина увеличивалась более чем в 50 раз в присутствии 16 мМ НР-β-CD. Диаграмма фазовой растворимости кверцетина в соответствии с концепцией Higuchi и Connors [7] может быть классифицирована как диаграмма A_L типа, что предполагает возрастание растворимости лиганда в результате образования комплекса включения. Рассчитанная константа ассоциации равна 3275 ± 448 М⁻¹.

Далее методом ИТС мы определили термодинамические параметры, описывающие образование комплексов включения НР-β-CD с кверцетином, измеряя тепловые эффекты титрования раствора флавоноида раствором НР-β-CD (за вычетом энергетического эффекта разбавления водных растворов НР-β-CD). Формирование комплекса включения характеризуется отрицательным значением изменения энтальпии (-4984 ± 242), что подразумевает, что в процессе взаимодействия компонентов комплекса преобладают водородные связи и силы Ван-дер-Ваальса. Значение изменения свободной энергии Гиббса (ΔG) отрицательно (-6357 ± 314), поэтому можно сделать вывод о том, что процесс комплексообразования кверцетина с НР-β-CD протекает самопроизвольно. Изменение значения энтропии (ΔS) положительно (4,6 ± 0,8), что указывает на уменьшение степени подвижности молекулы «гостя» в полости «хозяина». Как энтальпийный, так и энтропийный факторы вносят свой вклад в формирование комплексов, в то же время энтальпийный фактор преобладает над энтропийным. Методом ИТС нами также определена константа ассоциации комплекса кверцетин-НР-β-CD (4570 ± 1650), что свидетельствует о формировании стабильного комплекса и высоком средстве кверцетина к внутренней полости НР-β-CD.

2. *Антиоксидантный эффект кверцетина и его комплекса (кверцетин-НР-β-CD) in vitro при окислительном повреждении митохондрий печени крыс.* В соответствии с многочисленными наблюдениями, взаимодействие tВНР (700 мкМ) с митохондриями индуцировало выраженное

окислительное повреждение: пероксидацию мембранных липидов и истощение митохондриального GSH: содержание продуктов ТБКРС возрастало в 4,4 раза, концентрация GSH уменьшалась в 4,7 раза. Предварительное внесение в суспензию митохондрий кверцетина (5–50 мкМ) оказывало дозозависимый протекторный эффект: уровень ТБКРС в митохондриях при концентрации 5 мкМ достоверно уменьшался на 50 %, в то время как содержание GSH достоверно не изменялось; при концентрации 50 мкМ кверцетина уровень ТБКРС в митохондриях уменьшался на 60 %, содержание восстановленного глутатиона возрастало на 25 % по сравнению с митохондриями, экспонированными окислителю в отсутствие антиоксиданта ($p < 0,05$).

Включение кверцетина в супрамолекулярный комплекс с НР- β -CD повышало его антиоксидантный эффект. Так, в присутствии комплекса (50 мкМ кверцетин-НР- β -CD) содержание GSH в митохондриях, подвергнутых окислительному воздействию, было достоверно выше (на 30 %, $p < 0,05$) по сравнению с митохондриями, подвергнутыми действию tH₂O₂ в присутствии только кверцетина (50 мкМ). В то же время эффективность комплекса в реакции ингибирования процесса пероксидации липидов митохондриальных мембран не отличалось от эффективности кверцетина.

Растительные полифенолы обладают чрезвычайным структурным и химическим многообразием, несравнимым с разнообразием, представленным в синтетических библиотеках. Значительное количество природных химических соединений и их комбинаций не исследованы в качестве потенциальных терапевтических агентов. Детальные механизмы реализации полифенолами их благоприятных (или токсических эффектов) также требуют выяснения.

В настоящей работе мы рассмотрели стехиометрию, термодинамические параметры и антиоксидантные свойства кверцетина и комплекса кверцетин-НР- β -CD. Обнаруженное нами значительное увеличение растворимости кверцетина, включаемого в супрамолекулярный комплекс, по сравнению с нативным флавоноидом (растворимость возрастала более чем в 50 раз в присутствии НР- β -CD, 16 мМ), указывает на повышенную биодоступность. Подобным образом Güleç и Demirel продемонстрировали, что формирование комплекса кверцетин-метил- β -циклодекстрин увеличивает растворимость комплекса (в 254 раза) и его антиоксидантную активность (на 10 %) [2].

Ранее разными авторами были описаны биохимические и фармакологические эффекты включения полифенолов в супрамолекулярные комплексы с циклодекстринами. D'Agas с соавт. показали, что комплекс включения кверцетин-НР- β -CD сохраняет параметры электрохимического окисления флавоноида и способность хелатировать ионы железа, что связано с высвобождением флавоноида из полости молекулы «хозяина» [4].

Оцененная методом Higuchi и Connors константа ассоциации комплекса включения 1:1 кверцетин-НР- β -CD и равна $3275 \pm 448 \text{ M}^{-1}$. Ранее также было показано, что константа связывания и растворимость кверцетина в комплексе с β -циклодекстринами существенно выше в случае НР- β -CD по сравнению с β -CD, возрастая с увеличением числа групп заместителей, участвующих во взаимодействии с молекулой кверцетина, и гидрофобности молекул циклодекстринов.

Антиоксидантную активность флавоноидов связывают с наличием: 1) 3',4'-дигидроксидной (катехольной) группы в кольце В; 2) С4 = О кето-группы в кольце С; 3) 3-гидроксильного заместителя в кольце С; 4) С2 = С3 двойной связи в кольце С. Кверцетин, принадлежащий к классу флавоно-3-олов, содержит все четыре химические структуры, определяющие высокую антиоксидантную активность. Распределение электронной плотности в молекуле кверцетина, конформация молекулы, образование таутомерных форм внутри- и межмолекулярных водородных связей будут определять его анти-(про-)оксидантную активность.

В нашем эксперименте кверцетин *in vitro* эффективно ингибировал процессы перекисного окисления липидов, индуцируемые органическим гидропероксидом tBHP в митохондриях, и в меньшей степени предотвращал внутриклеточные и внутриорганельные процессы окисления глутатиона, что связано, вероятно, с распределением полифенола между мембранными структурами и цитоплазмой (матриксом в случае митохондрий). Поскольку известно, что взаимодействие tBHP с гем-содержащими белками митохондрий связано с образованием в первую очередь алкоксильного и пероксильного радикалов, можно предположить детоксикацию кверцетином именно этих радикалов, а также восстановление липоксильного радикала.

В нашем эксперименте включение кверцетина в супрамолекулярный комплекс с HP- β -CD достоверно увеличило антиоксидантную активность полифенола. В случае окислительного повреждения митохондрии печени крыс комплекс (50 мкМ) оказался более эффективным антиоксидантом по сравнению с кверцетином при оценке степени окисления глутатиона. Вероятно, включение полифенола в комплекс приводит к повышению его накопления в матриксе митохондрий. Возрастание антиоксидантной активности кверцетина в результате его включения в комплекс более значительно в водной фазе клетки по сравнению с липидной фазой.

Ранее Savic и соавт. продемонстрировали, что образование комплекса кверцетина и HP- β -CD существенно увеличивает растворимость в воде и фотостабильность [12]. Инкапсулирование флавонолов кверцетина и мирицетина во внутреннюю полость β - и γ -циклодекстринов (но не α -циклодекстринов) существенно ингибирует ферментативное окисление флавонолов пероксидазой [6]. Формирование комплекса рутин (кверцетин-3-О-рутинозид)-HP- β -CD ($K_s = 390,6 \text{ M}^{-1}$) повышает стабильность флавоноида и его антиоксидантную активность. В то же время для ряда флавоноидов (нарингенин, нарингин, гесперидин, дигидромирицетин) было показано, что образование комплекса связано с включением кольца В во внутреннюю полость HP- β -CD. Как предполагают, возрастание антиоксидантной активности рутина при комплексообразовании с циклодекстринами связано с усилением водород-донорных свойств гидроксильных групп рутина за счет формирования водородных связей с циклодекстринами.

Заключение. В настоящей работе мы рассмотрели стехиометрию, константу ассоциации и термодинамические параметры комплекса включения кверцетин-HP- β -CD, получаемого методом перемешивания в растворе и со-выпаривания. Кверцетин образует комплекс включения по типу «гость-хозяин» с HP- β -CD в молярном соотношении 1:1. Образование комплекса сопровождается увеличением растворимости кверцетина с ростом концентрации циклодекстрина (растворимость возрастала более чем в 50 раз в случае HP- β -CD, 16 мМ), что указывает на повышенную биодоступность кверцетина в структуре комплекса. Оцененная нами методом построения фазовых диаграмм растворимости константа ассоциации комплекса с HP- β -CD равна $3275 \pm 448 \text{ M}^{-1}$, что свидетельствует о высоком сродстве внутренней полости молекулы HP- β -CD к кверцетину. Комплексообразование характеризуется положительным значением изменения энтропии и высоким отрицательным значением изменения энтальпии, что свидетельствует о спонтанности и экзотермическом характере протекания процесса.

В настоящей работе мы сравнили эффективность кверцетина и комплекса включения HP- β -CD-кверцетин в коррекции нарушений окислительно-восстановительного баланса митохондрий печени крыс при моделировании окислительного стресса *in vitro*. Флавоноид и его комплекс (5–100 мкМ) дозозависимо ингибировали процессы перекисного окисления липидов и окисления восстановленного глутатиона. Включение в комплекс более выражено повышало антиоксидантную активность кверцетина в матриксе митохондрий по сравнению с липидной

фазой. Можно предположить взаимодействие кверцетина с алкоксильным и пероксильным радикалами, с гидропероксильным радикалом липидов.

Список литературы

1. D'Andrea, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic application / G. D'Andrea // *Fitoterapia*. — 2015. — Vol. 106. — P. 265–271.
2. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 1959. — Vol. 82, № 1. — P. 70–77.
3. Encapsulation of Quercetin and Myricetin in Cyclodextrins at Acidic pH / C. Lucas-Abellan [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* — 2008. — Vol. 56. — P. 255–259.
4. Güleç K. Characterization and Antioxidant Activity of Quercetin/Methyl- β -Cyclodextrin Complexes / K. Güleç, M. Demirel // *Curr. Drug Deliv.* — 2016. — Vol. 13, № 3. — P. 444–451.
5. Higuchi, T. Phase solubility techniques / T. Higuchi, K. A. Connors // *Journal of Analytical Chemistry*. — 1965. — Vol. 4, № 2. — P. 117–212.
6. Host-guest inclusion complex of quercetin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: A calorimetric study / F. D'Aria [et al.] // *J. Therm. Anal. Calorim.* — 2017. — Vol. 130, № 1. — P. 451–456.
7. Investigation of properties and structural characterization of the quercetin inclusion complex with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin / I. M. Savic [et al.] // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. — 2015. — Vol. 82. — P. 383–394.
8. ITC Data Analysis in Origin: Tutorial Guide, Northampton, 2004. — 121 p.
9. Johnson, D. Isolation of liver or kidney mitochondria / D. Johnson, H. A. Lardy // *Methods in Enzymology*. — 1967. — Vol. 10. — P. 94–101.
10. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites / X. Chen [et al.] // *Pharmaceutical Research*. — 2005. — Vol. 22. — P. 892–901.
11. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265–275.
12. Quercetin/ β -cyclodextrin inclusion complex embedded nanofibres: Slow release and high solubility / Z. Aytac [et al.] // *Food Chem.* — 2016. — Vol. 197. — P. 864–871.
13. Quercetin: Dietary sources, functions and health benefits / M. T. Mercader-Ros [et al.] // *Nova Science Pub Inc.* — 2012. — P. 179–198.
14. Stocks, J. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide / J. Stocks, T. L. Dormandy // *British Journal of Haematology*. — 1971. — Vol. 20, № 1. — P. 95–111.

STRUCTURE, THERMODYNAMIC PARAMETERS AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF THE QUERCETIN-HP- β -CD INCLUSION COMPLEX

Ilyich T.V.¹, Kovalenya T.A.¹, Lapshina E.A.¹, Buko V.U.², Zavodnik I.B.¹

*¹Yanka Kupala State University of Grodno,
Grodno, Republic of Belarus;*

*²Institute of Biochemistry of Biologically Active Substances,
National Academy of Science, Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *In this work, we evaluated the stoichiometry, association constant, and thermodynamic parameters of quercetin complexation with HP- β -CD, compared the efficacy of the flavonoid and inclusion complex in the correction of rat liver mitochondria redox balance during modeling of oxidative stress in vitro with tert-butyl hydroperoxide (700 μ M).*

ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И НАРУШЕНИЙ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В КРОВИ КРЫС ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛЕНИИ, УГНЕТЕНИИ СИСТЕМЫ КОФЕРМЕНТА А И КОРРЕКЦИИ МОДУЛЯТОРАМИ БИОСИНТЕЗА ГЛУТАТИОНА И КОФЕРМЕНТА А

*Катковская И.Н.¹, Лукиенко Е.П.¹, Максимчик Ю.З.¹,
Семенович Д.С.¹, Титко О.В.¹, Филипович Н.А.¹, Канунникова Н.П.^{1,2}*

¹*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь;*

²*Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Я. Купалы»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Системное воспаление, вызванное введением крысам бактериального ЛПС и предшествующем 7-дневном назначением внутрь ГПК, приводит к развитию окислительного стресса, повышению содержания глутатиона в эритроцитах и уровня белковых тиолов в плазме. Введение животным пантенола, комбинации пантенола с ацетилцистеином на этом фоне приводит к ослаблению проявлений окислительного стресса и возвращению показателей системы глутатиона и белковых тиолов к значениям в контроле.

Введение. По современным представлениям, в развитие окислительного стресса (ОС) существенный вклад вносят нарушения тиол-дисульфидного баланса, в регуляции которого система глутатиона играет главенствующую роль [13]. В настоящей работе было изучено развитие окислительного стресса при эндогенной интоксикации, инициированной введением бактериального липополисахарида (ЛПС) на фоне введения субтоксических доз гомопантотеновой кислоты (ГПК). ГПК является конкурентным ингибитором ключевого фермента биосинтеза КоА — пантотенаткиназы [7] и может участвовать в регуляции редокс-статуса системы глутатиона [4]. В качестве возможных корректоров метаболических нарушений, инициируемых введением ЛПС и ГПК, были использованы D-пантенол — ксенобиотический предшественник КоА (ПЛ), а также предшественник биосинтеза глутатиона — N-ацетилцистеин (АЦЦ).

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Wistar CRL: (WI) WUBR массой 180–200 г, полученных при разведении в виварии Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. Экспериментальные исследования выполнялись в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях (от 22 сентября 2010 г.).

Были изучены эффекты предшественника глутатиона АЦЦ (200 мг/кг, в/ж) и предшественника КоА ПЛ (200 мг/кг, в/ж) при системном воспалении, вызванном введением крысам ЛПС (*Escherichia coli* O111:B4, 0,5 мг/кг, в/бр, однократно, за 24 ч до декапитации) и предшествующем введении ГПК (200 мг/кг, в/ж) в течение 7 дней. АЦЦ и ПЛ также вводили животным в течение 7 дней. Выведение животных из эксперимента производили на 8-й день путем дека-

питации. Показатели активности ПОЛ и тиол-дисульфидного статуса изучали в плазме и эритроцитах крови крыс.

Окислительный стресс оценивали по содержанию диметилфенилендиамин-реагирующих соединений (ДФАРС) [14] и уровню общей антиоксидантной активности (ОАА) [8] в плазме крови. Активность супероксиддисмутазы (СОД) [3], каталазы [1] и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [11] измеряли в плазме и эритроцитах спектрофотометрически. Состояние мембран эритроцитов оценивали по их сорбционной способности [2]. Для оценки тиол-дисульфидного статуса определяли содержание восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона [5, 12] в эритроцитах и содержание белковых тиольных групп в плазме крови [10]. Активность глутатионтрансферазы (ГТ) [9] и глутатионредуктазы (ГР) [6] измеряли спектрофотометрически.

Результаты исследования и их обсуждение. Введение крысам бактериального липополисахарида на фоне ГПК не сопровождалось заметным повышением температуры тела животных, тем не менее повышение температуры тела на 2,7 % ($p < 0,05$) происходило у животных, которым вводили комбинацию ГПК+ЛПС с АЦЦ и ГПК+ЛПС с сочетанным введением АЦЦ и ПЛ. При этом в плазме крови наблюдалось повышение уровня ДФАРС на 21 % и снижение общей антиоксидантной активности на 24 % (табл. 1).

Таблица 1 — Показатели окислительного стресса в плазме крови крыс при сочетанном введении гомопантотеновой кислоты и бактериального липополисахарида и коррекции N-ацетилцистеином и пантенолом (M ± SD, n = 7)

Группы	ДФАРС, Е/мл	ОАА, Е/мл
Контроль	278,25 ± 39,18	7,31 ± 1,22
ГПК	338,00 ± 41,17*	5,53 ± 0,50*
ГПК+ЛПС	351,75 ± 14,29*	5,28 ± 0,53*
ГПК+ЛПС+АЦЦ	411,25 ± 39,92*	3,99 ± 0,86*
ГПК+ЛПС+АЦЦ+ПЛ	413,50 ± 22,15*	4,38 ± 0,62*

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Активность супероксиддисмутазы ни в плазме, ни в эритроцитах достоверно не изменилась на фоне ГПК или ГПК+ЛПС, но снизилась в плазме в группе ГПК+ЛПС +АЦЦ, а в эритроцитах — при действии ГПК+ЛПС и обоих корректоров (табл. 2).

Таблица 2 — Активность супероксиддисмутазы в крови крыс при сочетанном введении гомопантотеновой кислоты и бактериального липополисахарида и коррекции N-ацетилцистеином и пантенолом (M ± SD, n = 7)

Группы	Плазма, ед/мг белка	Эритроциты, ед/г Hb
Контроль	1,03 ± 0,15	2,43 ± 0,16
ГПК	0,92 ± 0,10	2,54 ± 0,31
ГПК+ЛПС	0,99 ± 0,07	2,49 ± 0,25
ГПК+ЛПС+АЦЦ	0,85 ± 0,05*	2,28 ± 0,20
ГПК+АЦЦ +ЛПС+ПЛ	0,91 ± 0,10	2,10 ± 0,17*

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Повышение активности каталазы, важного фермента антиоксидантной защиты, на 28 % наблюдалось при назначении ГПК+ЛПС (табл. 3). Этот эффект снимался при дополнительном введении АЦЦ и АЦЦ + ПЛ.

Таблица 3 — Активность каталазы в эритроцитах крыс при сочетанном введении гомопантотеновой кислоты и бактериального липополисахарида и коррекции N-ацетилцистеином и пантенолом (M ± SD, n = 7)

Группы	мкмоль H ₂ O ₂ /мин/г Hb
Контроль	243,8 ± 37,3
ГПК	278,1 ± 20,8
ГПК+ЛПС	312,3 ± 40,6*
ГПК+ЛПС+АЦЦ	256,7 ± 16,5
ГПК+АЦЦ+ЛПС+ПЛ	277,6 ± 19,5

Примечание: * p < 0,05 по отношению к контролю.

Эти изменения сопровождались повышением сорбционной активности эритроцитарной мембраны, что отразилось в повышении поглощения эритроцитами нильского голубого, но не метиленового синего при действии ГПК и ЛПС (табл. 4). Данный эффект полностью нивелировался дополнительным введением АЦЦ и пантенола.

Таблица 4 — Показатели сорбции катионных красителей нильского голубого и метиленового синего в эритроцитах крыс при сочетанном введении гомопантотеновой кислоты и бактериального липополисахарида и коррекции N-ацетилцистеином и пантенолом (M ± SD, n = 7)

Группы	Нильский голубой, %	Метиленовый синий, %
Контроль	83,3 ± 2,60	74,0 ± 3,31
ГПК	88,3 ± 1,19*	72,7 ± 4,38
ГПК+ЛПС	90,2 ± 1,45*	72,4 ± 4,38
ГПК+ЛПС+АЦЦ	87,6 ± 1,23*	70,3 ± 3,82
ГПК+ЛПС+АЦЦ+ПЛ	83,6 ± 2,65	76,6 ± 1,65

Примечание: * p < 0,05 по отношению к контролю.

Активность холинэстеразы в плазме крови не претерпевала значительных изменений, тогда как в эритроцитах активность фермента повысилась во всех экспериментальных группах (табл. 5).

Таблица 5 — Активность ацетилхолинэстеразы в плазме и эритроцитах крови белых крыс при сочетанном введении гомопантотеновой кислоты и бактериального липополисахарида и коррекции N-ацетилцистеином и пантенолом (M ± SD, n = 7)

Группы	Плазма, мкмоль АТХ/мин/мг белка	Эритроциты, мкмоль АТХ/мин/г Hb
Контроль	7,68 ± 1,47	8,78 ± 0,87
ГПК	6,95 ± 0,58	12,7 ± 0,91*
ГПК+ЛПС	7,15 ± 0,68	13,2 ± 1,16*
ГПК+ЛПС+АЦЦ	8,23 ± 0,63	13,9 ± 1,71*
ГПК+ЛПС+АЦЦ+ПЛ	6,60 ± 0,84	11,9 ± 1,73*

Примечание: * p < 0,05 по отношению к контролю.

Активация процессов свободнорадикального окисления сопровождалась изменениями уровня тиолов. Так, нами отмечено повышение содержания белковых тиолов в плазме при действии комбинации ГПК+ЛПС, но еще более высокий уровень белковых тиолов наблюдался при действии одной ГПК (табл. 6). Введение АЦЦ и АЦЦ+ПЛ приводило к снижению уровня тиолов в плазме крови.

Таблица 6 — Изменение показателей окислительного стресса в плазме крови крыс при сочетанном введении гомопантотеновой кислоты и бактериального липополисахарида и коррекции N-ацетилцистеином и пантенолом (M ± SD, n = 7)

Группы	Белковые SH-группы	
	мкмоль/мл плазмы	мкмоль/мг белка
Контроль	333,58 ± 13,63	5,43 ± 0,26
ГПК	411,52 ± 29,11*	6,57 ± 0,66*
ГПК+ЛПС	371,57 ± 35,98*	6,12 ± 0,67*
ГПК+АЦЦ+ЛПС	267,57 ± 35,98*	4,16 ± 0,32*
ГПК+АЦЦ+ЛПС+ПЛ	299,14 ± 26,39*	4,62 ± 0,50*

Примечание: * p < 0,05 по отношению к контролю.

Параллельно происходило повышение содержания и восстановленной, и окисленной форм глутатиона, а также их суммы в эритроцитах при действии ГПК (табл. 7), однако при действии комбинации ГПК+ЛПС этот сдвиг оказался более слабо выраженным. Введение АЦЦ и комбинации АЦЦ с ПЛ приводило к возвращению уровня обеих форм глутатиона к значениям в контроле.

Таблица 7 — Содержание глутатиона (мкмоль/г Hb) в эритроцитах при сочетанном введении гомопантотеновой кислоты и бактериального липополисахарида и коррекции N-ацетилцистеином и пантенолом (M ± SD, n = 7)

Группы	GSH	GSSG	GSH+2GSSG
Контроль	9,30 ± 0,50	0,405 ± 0,018	10,11 ± 0,53
ГПК	13,66 ± 2,52*	0,601 ± 0,075*	14,86 ± 2,67*
ГПК+ЛПС	11,03 ± 1,43*	0,486 ± 0,048	12,00 ± 1,52
ГПК+ЛПС+АЦЦ	8,22 ± 1,14	0,377 ± 0,058	8,98 ± 1,25
ГПК+ЛПС+АЦЦ+ПЛ	8,03 ± 0,78	0,368 ± 0,026	8,77 ± 0,82

Примечание: * p < 0,05 по отношению к контролю.

Соотношение GSH/GSSG, которое в значительной мере отражает восстановительный потенциал системы глутатиона, не изменилось ни в одной экспериментальной группе (табл. 8), хотя расчет значения редокс-потенциала показал его снижение, т. е. сдвиг в сторону окисления в группе, подвергнутой действию обоих корректоров на фоне ГПК и ЛПС.

Таблица 8 — Соотношение восстановленного глутатиона к окисленному и редокс-потенциал в эритроцитах крыс при сочетанном введении гомопантотеновой кислоты и бактериального липополисахарида и коррекции N-ацетилцистеином и пантенолом (M ± SD, n = 7)

Группы	GSH/GSSG	Eh, мВ
Контроль	22,95 ± 0,82	- 205,10 ± 1,23
ГПК	22,60 ± 1,56	- 206,30 ± 2,88
ГПК+ЛПС	22,67 ± 0,75	-205,50 ± 1,79
ГПК+ЛПС+АЦЦ	21,86 ± 0,66	-202,20 ± 1,61
ГПК+ЛПС+АЦЦ+ПЛ	21,82 ± 1,23	-201,40 ± 1,82*

Примечание: * p < 0,05 по отношению к контролю.

Эти изменения подтверждаются отсутствием изменений активности основного фермента восстановления глутатиона — глутатионредуктазы (табл. 9), в то время как активность важного фермента его окисления — глутатионтрансферазы, также оказалась повышенной в группе при действии обоих корректоров на фоне ГПК и ЛПС.

Таблица 9 — Активность глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) в эритроцитах крыс при сочетанном введении гомопантотеновой кислоты и бактериального липополисахарида и коррекции N-ацетилцистеином и пантенолом (M ± SD, n = 7)

Группа	ГР, мкмоль NADPH/мин/г Hb	ГТ, мкмоль ХДНБ/мин/г Hb
Контроль	0,28 ± 0,07	1,70 ± 0,26
ГПК	0,23 ± 0,03	2,15 ± 0,71
ГПК+ЛПС	0,21 ± 0,02	2,14 ± 0,29
ГПК+ЛПС+АЦЦ	0,22 ± 0,04	2,19 ± 0,30
ГПК+ЛПС+АЦЦ+ПЛ	0,25 ± 0,06	2,79 ± 0,53*

Примечание: * p < 0,05 по отношению к контролю.

Заключение. Системное воспаление, вызванное введением крысам бактериального ЛПС и предшествующем 7-дневном назначении внутрь ГПК, приводит к развитию окислительного стресса, проявившегося в повышении уровня продуктов ПОЛ и снижении ОАА в плазме крови, повышении сорбционной способности мембраны эритроцитов и активации АХЭ в эритроцитах. При этом наблюдается повышение содержания общего, восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах, а также увеличение уровня белковых SH-групп в плазме. Введение животным пантенола, комбинации пантенола с ацетилцистеином на фоне окислительного стресса приводит к ослаблению проявлений окислительного стресса и возвращению показателей системы глутатиона и белковых тиолов к значениям в контроле. Таким образом, обосновывается необходимость дальнейшего изучения действия комбинации пантенола и ацетилцистеина для защиты тканей от повреждений, инициируемых окислительным стрессом и сдвигами тиол-дисульфидного баланса.

Список литературы

1. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–19.
2. Новый способ оценки повреждения эритроцитов по связыванию катионного красителя / В.Б. Гаврилов [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 2000. — Т. 44, № 5. — С. 87–90.
3. Сирота, Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т.В. Сирота // Вопр. мед. химии. — 1999. — Т. 45, № 1. — С. 263–272.
4. Эффекты модулирования системы КоА при эндогенной интоксикации / А. Г. Мойсеёнок [и др.] // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. — Минск, 2011. — Вып. 17. — С. 99–104.
5. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide / D. Giustarini [et al.] // Nat. Protoc. — 2013. — Vol. 8, № 9. — P. 1660–1669.
6. Carlberg, I. Glutathione reductase / I. Carlberg, B. Mannervik // Methods Enzymol. — 1985. — Vol. 13. — P. 484–490.
7. Chemical Knockout of Pantothenate Kinase Reveals the Metabolic and Genetic Program Responsible for Hepatic Coenzyme A Homeostasis / Yong-Mei Zhang [et al.] // Chemistry & Biology. — 2007. — Vol. 14 — P. 291–302.
8. Erel, O. A novel automated direct measurement for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation / O. Erel // Clin. Biochem. — 2004. — Vol. 37. — P. 277–285.
9. Habig, W.H. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby // J. Biol. Chem. — 1974. — Vol. 249, № 22. — P. 7130–7139.
10. Instructions Ellman's reagent [Electronic resource] // PIERCE, 3747 N. Meridian Road P.O. Box 117, Rockford, IL 61105. — Mode of access: www.piercent.com. — Date of access: 23.08.2015.

11. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparation / V. Gorun [et al.] // *Anal. Biochem.* — 1978. — Vol. 86. — P. 324–326.
12. Rahman, I. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method / I. Rahman, A. Code, S.K. Biswas // *Nature Protocols.* — 2006. — Vol. 1. — P. 3159–3165.
13. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine / H. Sies // *Redox Biol.* — 2015. — Vol. 4. — P. 180–183.
14. Use of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine to evaluate the oxidative status of human plasma / V. Verde [et al.] // *Free Radical Research.* — 2002. — Vol. 36, № 8. — P. 869–873.

**PECULIARITIES OF OXIDATIVE STRESS AND DISORDERS
IN THE RAT BLOOD GLUTATHIONE SYSTEM FOLLOWING SYSTEM
INFLAMMATION, SYSTEM C_oA INHIBITION AND CORRECTION
BY GLUTATHIONE AND C_oA BIOSYNTHESIS MODULATORS**

*Katkovskaya I.N.¹, Lukiyenko E.P.¹, Maksimchyk Yu.Z.¹, Semenovich D.S.¹, Titko O.V.¹,
Filipovich N.A.¹, Kanunnikova N.P.¹*

*Institute of Biochemistry of Biologically Active Substances,
National Academy of Science,
Grodno, Republic of Belarus;
¹Yanka Kupala State University of Grodno,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *Systemic inflammation caused by the administration of bacterial LPS to rats and a previous 7-day intravenous administration of HPA leads to the development of oxidative stress, an increase in the content of glutathione in red blood cells and the level of protein thiols in plasma. The administration of panthenol to animals, the combination of panthenol with acetylcysteine in this situation, leads to a weakening of the manifestations of oxidative stress and a return of the glutathione system and protein thiol parameters to the control values .*

ТРАНСКЕТОЛАЗА И НЕКОТОРЫЕ СУБСТРАТЫ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ В РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА ФОСФОРИБОЗИЛПИРОФОСФАТА

Кубышин В.Л.¹, Зиматкина Т.И.²

¹Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь;

²Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

Резюме. Исследовано влияние метаболитов пентозофосфатного пути рибозо-5-фосфата, равновесной смеси пентозофосфатов (рибозо-5-фосфата, ксилулозо-5-фосфата, рибулозо-5-фосфата), глюкозо-6-фосфата, АТФ на синтез фосфорибозилпирофосфата в гемолизатах эритроцитов крыс. Показано, что фосфорибозилпирофосфатсинтетаза эритроцитов высоко чувствительна к изменению концентраций рибозо-5-фосфата ($K_m = 0,18$ мМ), АТФ ($K_m = 0,36$ мМ), пентозофосфатов, глюкозо-6-фосфата. Внесение высокоочищенного препарата транскетолазы в поликомпонентную систему гемолизатов эритроцитов сопровождается значительным торможением биосинтеза фосфорибозилпирофосфата. Предполагается, что действие транскетолазы обусловлено влиянием на концентрации пентозофосфатов; также не исключена роль продуктов неокислительных реакций ПФП, действующих как ингибиторы фосфорибозилпирофосфатсинтетазы.

Введение. Биосинтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот во многом определяется внутриклеточной концентрацией фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ), синтез которого зависит от обмена пентозофосфатов. Известно, что внутриклеточная концентрация фосфорилированных пентоз сохраняется на относительно низком уровне и является одним из малоизученных вопросов. ПФП рассматривается как основная метаболитная система реакций, формирующая клеточный фонд фосфопентоз, поток которых направлен на биосинтез нуклеотидов, нуклеиновых кислот, нуклеотидных коферментов и гликолитических превращений [4]. Сравнительно невысокая активность ключевого фермента неокислительного звена пентозного цикла транскетолазы (ТК) в большинстве тканей животных определяет скорость и направление потока «фосфопентозы < ___ > фосфогексозы» [8]. Изменение активности ТК дает возможность изучения регуляторной роли фермента в обмене фосфопентоз, а также синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Биосинтез внутриклеточных нуклеотидов осуществляется при участии таких ферментов, как гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ), аденинфосфорибозилтрансферазы (АФРТ) и зависит от концентрации фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ), который синтезируется из рибозо-5-фосфата (Р-5-Ф) и АТФ в фосфорибозилпирофосфатсинтетазной реакции (ФРПФС). Активность ФРПФС рассматривается как регуляторное звено формирования нуклеотидов путем *de novo* синтеза [6].

Другим важным фактором синтеза нуклеотидов является концентрация ФРПФ в тканях, которая зависит от доступности одного из предшественников Р-5-Ф, субстрата ФРПФ синтетазной реакции. Р-5-Ф в тканях синтезируется преимущественно окислительными и неокислительными реакциями (ПФП), где на долю неокислительных реакций, для эритроцитов человека, приходится до 80 % [3]. Показано, что недостаточность или полное отсутствие глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции в эритроцитах не влияет на стационарную концентрацию

ФРПФ [1]. Эти данные характеризуют ТК-трансальдозазную реакции как важное стабилизирующее звено в клеточном синтезе рассматриваемого метаболита, где ТК для многих тканей характеризуется как лимитирующий тиаминзависимый фермент.

Цель данной работы заключалась в исследовании роли ТК во внутриклеточном синтезе ФРПФ в эритроцитах и почках крыс, а также влияния некоторых метаболитов ПФП на синтез азотистых оснований.

Материалы и методы исследования. Гемолизированные эритроциты центрифугировали 30 мин при 1700 g и хранили при -10°C . После размораживания гемолизаты центрифугировали на холоду и полученный супернатант использовали как источник ферментов в синтезе инозинмонофосфата (^{14}C -ИМФ). Реакционная смесь для определения активности ГГФРТ состояла из 0,1 мл трис-НСI буферного раствора рН 7,4, содержащего 5мМ хлористого магния, ФРПФ в качестве субстрата, 0,1 мл ^{14}C -гипоксантина (0,08 МБк), 0,1 мл гемолизата, 0,005 мл 0,4М калий-фосфатного буфера рН 7,4. Разделение меченных субстратов и продуктов реакции проводили методом восходящей тонкослойной хроматографии на пластинках силуфол в течение 1,5 ч смесью бутанол : метанол (25 %) : аммиак : вода в соотношении 60 : 20 : 1 : 20 по объему. R_f для гипоксантина — 0,36, для ИМФ — 0,07. Измерение радиоактивности продуктов реакции проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике Нуклеар Чикаго.

В работе использовали [^{14}C]-гипоксантин, ФРПФ фирмы «Серва», P-5-Ф-«Реанал» (Венгрия). Пентозофосфатную смесь синтезировали по методу [1]. ТК получали с помощью ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе и адсорбционной — на гидроксилапатите [2]. Чистоту ферментного препарата характеризовали по данным гель-электрофореза в 7%-м полиакриламидном геле и по удельной активности, которую определяли спектрофотометрически с использованием α -глицерофосфатдегидрогеназы, триозофосфатизомеразы, изомеразы и эпимеразы пентозофосфатов и P-5-Ф в качестве субстрата.

Результаты исследования и их обсуждение. В экспериментах *in vitro* установлено, что система гемолизатов эритроцитов интенсивно синтезирует ФРПФ из P-5-Ф и АТФ и утилизируют его в реакции конденсации с азотистыми основаниями. Используя P-5-Ф или ФРПФ в качестве субстратов, проводили дифференциальное определение активности синтетазы ФРПФ и ГГФРТ.

Скорость синтеза ^{14}C -ИМФ существенно различается в зависимости от использованного субстрата, указывая, что активность ГГФРТ значительно выше синтетазы ФРПФ (рис. 1).

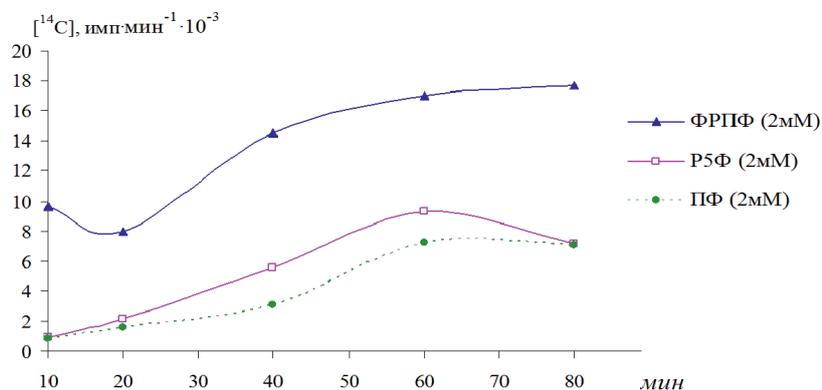


Рисунок 1 — Синтез [^{14}C]-ИМФ гемолизатами эритроцитов крыс в зависимости от длительности инкубации с ФРПФ, P5Ф, П

Учитывая это обстоятельство, характеризующее указанный объект как удобную биохимическую систему, проведены изучения регуляторных свойств различных внутриклеточных ин-

термедиатов ПФП на активность синтетазы ФРПФ. Высокая чувствительность ФРПФ синтетазы к изменению концентрации Р-5-Ф показана в экспериментах, где варьировали уровень Р-5-Ф при фиксированной величине АТФ (рис. 2).

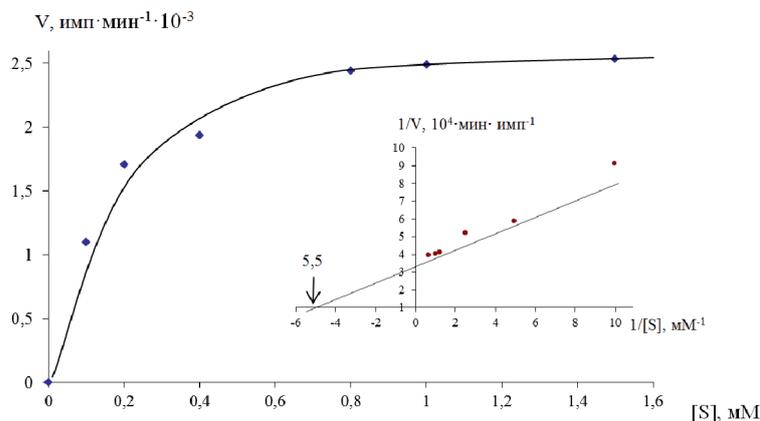


Рисунок 2 — Зависимость начальной скорости ФРПФС реакции от концентрации Р-5-Ф

Из представленных данных видно, что при концентрации Р-5-Ф, равной 1мМ, достигается субстратное насыщение, так как кажущееся значение K_m по субстрату составляет 0,18 мМ, что по абсолютной величине сравнимо с аналогичным параметром для очищенного фермента из печени крысы и шпината. Так как внутриклеточная концентрация Р-5-Ф в тканях животных существенно ниже величины K_m ФРПФ синтетазы по субстрату [5], это дает основание оценивать Р-5-Ф в качестве одного из возможных регуляторов во внутриклеточном синтезе ФРПФ и зависимых от него процессов.

В поликомпонентной системе гемолизатов эритроцитов экзогенный Р-5-Ф под действием неокислительных ферментов рибозо-5-фосфатизомеразы и рибулозо-5-фосфатэпимеразы превращается в равновесную смесь фосфорилированных пентоз, состоящей из рибозо-5-фосфата, ксилулозо-5-фосфата, рибулозо-5-фосфата. Их соотношение составило соответственно 53 %, 27 %, 17 %, что доказывает их равнозначность как предшественников в синтезе ФРПФ (см. рис. 1). При высоких концентрациях как Р-5-Ф, так и АТФ наблюдается эффект субстратного ингибирования ФРПФ-синтетазы. Значение K_m ФРПФ-синтезазной реакции для АТФ значительно ниже внутриклеточной концентрации нуклеотида, а следовательно, этот фактор оказывает менее существенное влияние на клеточный синтез ФРПФ (рис. 3).

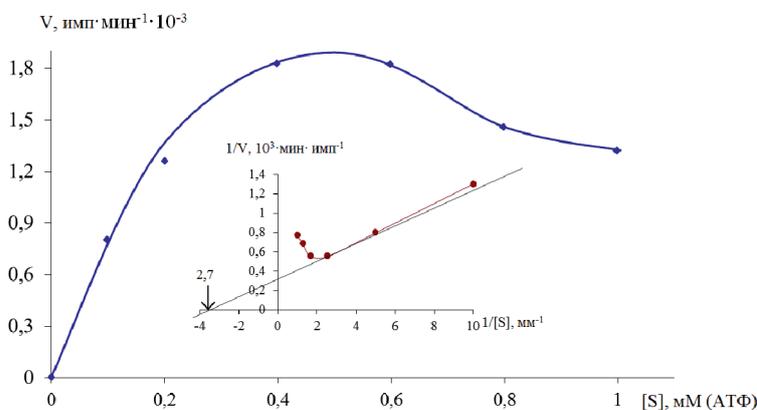


Рисунок 3 — Зависимость скорости реакции ФРПФ синтетазы от концентрации АТФ

Эндогенный уровень концентраций субстратов-предшественников ФРПФ обеспечивает относительно невысокие скорости его синтеза в эритроцитах. Лимитирование биосинтеза обуславливается пентозным компонентом, так как внесение Р-5-Ф или смеси фосфопентоз резко активизирует этот процесс. Существенная роль Р-5-Ф в обмене ФРПФ затрагивает вопрос о путях его внутриклеточной наработки и механизмах регуляции биосинтеза интермедиатов. Основным источником фосфопентоз в клетке являются окислительные и неокислительные реакции пентозного цикла, который можно рассматривать как два независимых пути формирования Р-5-Ф. Окислительная ветвь характеризуется векторностью в синтезе фосфопентозы, тогда как неокислительными ТК-трансальдозазными превращениями углеводов осуществляется как синтез, так и утилизация фосфорилированных сахаров. Вклад неокислительных реакций в наработку фосфопентоз преобладает. ТК можно рассматривать как фермент, занимающий ключевую позицию в переключении гликолитического метаболитного потока на пентозофосфатный путь, поставляющий рибозный компонент для синтеза азотистых оснований, и роль обратимых ТК реакций в сохранении гомеостатического баланса фосфорилированных сахаров в тканях остается предметом исследований.

Частичное или полное блокирование активности ТК в микроорганизмах сопровождается накоплением Р-5-Ф. Отмечается повышенное содержание пентозофосфатов в ткани печени тиаминдефицитных крыс, характеризующихся сниженной активностью ТК. Критерием, характеризующим ТК реакцию как «лимитирующее звено», выступают данные по сравнительной оценке активности ферментов неокислительной ветви ПФП, что свидетельствует в пользу равновесной регуляции внутриклеточных метаболитов ТК [7]. Константа равновесия для ТК печени крысы, полученная *in vitro* с такими субстратами, как Р-5-Ф и К-5-Ф, равнялись 0,59. Константа равновесия, полученная теоретически из внутриклеточного содержания Р-5-Ф, седогептулозо-7-фосфата, К-5-Ф, и глицеральдегид-3-фосфата в печени крысы, приближается к этому значению и составляет 0,5. Полученные данные позволяют рассматривать ТК-реакцию как систему с равновесным контролем, где концентрации реагирующих субстратов и продуктов реакции определяют направление метаболитного потока «гексозофосфаты < __ > пентозофосфаты». Снижение активности ТК-реакции можно рассматривать как регуляторное звено сохранения фонда Р-5-Ф. В экспериментах, где варьировали активность ТК в гемолизатах эритроцитов посредством внесения высокоочищенного фермента, наблюдали существенное снижение синтеза ИМФ (рис. 4).

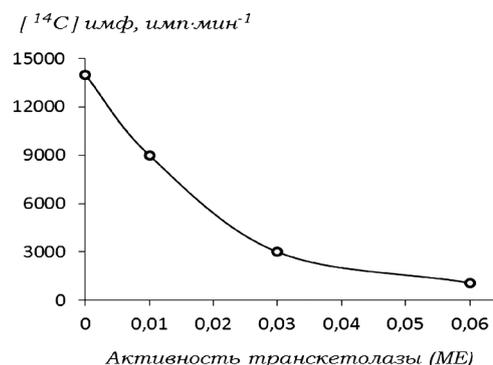


Рисунок 4 — Влияние ТК на доступность ФРПФ в синтезе ИМФ гемолизатами эритроцитов

С увеличением активности вносимого фермента это действие усиливалось. Следовательно, интенсивность ТК реакций можно рассматривать как регуляторный фактор, контролирующий уро-

вень концентрации Р-5-Ф субстрата-предшественника ФРПФ. Так как ингибирование ФРПФС зависело от длительности инкубации гемолизатов с экзогенной ТК, есть основание рассуждать о существенной регуляторной роли продуктов ТК-трансальдозазных реакций в изучаемом процессе.

Возможное влияние субстратов гликолиза (фосфорилированных гексоз) на синтез ФРПФ изучали в экспериментах, где установлено, что преинкубация гемолизатов эритроцитов крыс с глюкозо-6-фосфатом в различных концентрациях существенно влияет на синтез ФРПФ (рис. 5). Следовательно, помимо эффекторного действия Р-5-Ф, синтез ФРПФ в клетке находится под контролем глюкозо-6-фосфата и, возможно, других фосфорилированных сахаров.

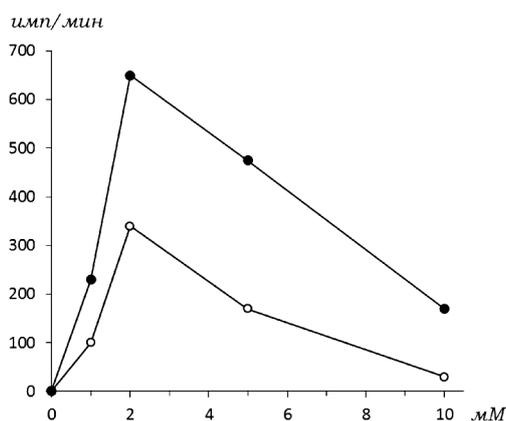


Рисунок 5 — Синтез ФРПФ в зависимости от концентрации глюкозо-6-фосфата:
 о———о — время инкубации 20 мин; •———• — 80 мин

Таким образом, не только Р-5-Ф оказывает существенное влияние на скорость синтеза ФРПФ, но и внесение высокоочищенного препарата ТК, значительно превышающей активность экзогенного фермента в гемолизатах эритроцитов, сопровождается снижением скорости синтеза ФРПФ. Следовательно, можно предположить, что высокая активность ТК обуславливает интенсивную утилизацию пентозофосфатов, тем самым снижая концентрацию субстрата синтеза ФРПФ. В эффекте ТК на биосинтез ФРПФ гемолизатами эритроцитов решающее значение могут иметь продукты ТК-реакции как возможные ингибиторы синтетазы ФРПФ. Это предположение наиболее вероятно, учитывая влияние глюкозо-6-фосфата на этот процесс.

В независимом эксперименте по ингибированию ТК окситиамином уровень ФРПФ в ткани почки опытного варианта ($98,7 \pm 12,9$) был достоверно выше (в 1,7–2 раза), чем в контроле ($52,4 \pm 5,1$; $P < 0,01$). Этот эффект наблюдался через 24 часа после действия антиметаболита, когда активность ТК-ткани почки снизилась на 30–40 %. Более длительное воздействие антиметаболита в условиях насыщения вызвало снижение активности фермента до 60 % от величины контрольных животных. Повышение концентрации ФРПФ объясняется торможением ферментативной активности ТК-реакции, за счет которой осуществляется утилизация фосфорилированных форм пентоз, в том числе Р-5-Ф, но также и снижением метаболизма ФРПФ по пути биосинтеза нуклеиновых кислот.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что в ткани почек крыс ингибирование ТК окситиамином приводит к изменению уровня внутриклеточной концентрации ФРПФ. Полученные данные подтверждены в экспериментах с гемолизатами эритроцитов. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ТК контролирует образование ФРПФ и координирует направление потока фосфорилированных сахаров по ПФП или гликолитическому пути. Обнаруженные метаболитные сдвиги на уровне пентозофосфатов и нуклеиновых кислот у животных при снижении активности ТК могут стать основой для фор-

мирования новой концепции о регуляторной роли фермента в обмене нуклеиновых кислот. Выявленные закономерности между активностью ТК и биосинтезом нуклеотидов и нуклеиновых кислот дает основание рекомендовать к широкому клиническому испытанию ингибиторы фермента как перспективные лечебные средства при некоторых видах патологии.

Список литературы

1. Кубышин, В.Л. Эффективный и доступный метод выделения неокислительных ферментов ПФП из печени крыс / В.Л. Кубышин, З.В. Горбач // Известия АН БССР / Сер. биол. наук. — 1992. — № 5–6. — С. 38–41.
2. Очистка и свойства транскетолазы печени крыс / З.В. Горбач [и др.] // Биохимия. — 1981. — Т. 46, вып. 11. — С. 1963–1969.
3. Becker, M.A. Synthesis of phosphoribosylpyrophosphate in mammalian cells / M.A. Becker, K.O. Raivio, J.E. Seegmiller // Adv. Enzymol. — 1979. — Vol. 49. — P. 281–306.
4. Casazza, J.P. The content of pentose cycle intermediates in liver starved fed ad libitum and meal fed rats / J.P. Casazza, R.L. Veech // J. Biochem. — 1986. — Vol. 261, № 2. — P. 690–698.
5. Krath, B.N. Implication of secondary structure prediction and amino acid sequence comparison of class I and class II phosphoribosyl diphosphate synthases on catalysis, regulation, and quaternary structure / B.N. Krath, B. Hove-Jensen // Protein Sci. — 2001. — № 10. — P. 2317–2324.
6. Sakuma, R. Phosphoribosylpyrophosphate synthetase in human erythrocytes: assay and kinetic studies using high-performance liquid chromatography / R. Sakuma, T. Nishina, H. Yamanaka // Clin. Chim. Acta. — 1991. — № 16. — P. 143–152.
7. The crystal structure of human transketolase and new insights into its mode of action / L. Mitschke [et al.] // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, № 41. — P. 31559–31570.
8. Zhao, J. A review on research progress of transketolase / J. Zhao, C.J. Zhong // Neurosci. Bull. — 2009. — Vol. 25, № 2. — P. 94–99.

TRANSKETOLASE AND SOME SUBSTRATES OF THE PENTOSEPHOSPHATE PATHWAY IN REGULATION SYNTHESIS OF PHOSPHORIBOSYL PYROPHOSPHATE

Kubyshin V.L.¹, Zimatkina T.I.²

¹*Grodno State Agrarian University Grodno, Republic of Belarus;*

²*Grodno State Medical University Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The influence of metabolites of pentose phosphate pathway such as ribose-5-phosphate, an equilibrium mix of pentose phosphates (ribose-5-phosphate, xylulose-5-phosphate, ribulose-5-phosphate), glucose-6-phosphate, as well as ATP and P_i on the synthesis of phosphoribosyl pyrophosphate in erythrocyte hemolysates of rats was investigated. It was shown that phosphoribosyl pyrophosphate synthetase from erythrocytes was highly sensitive to changes in concentrations of ribose-5-phosphate ($K_m = 0.18mM$), ATP ($K_m = 0.36mM$), pentose phosphates, glucose-6-phosphate. The addition of purified transketolase into hemolysates of erythrocytes was accompanied by significant blocking of biosynthesis of phosphoribosyl pyrophosphate. It is suggested that the action of transketolase was due to its influence on the concentrations of pentose phosphates. The role of the products of transketolase reactions, which could operate as inhibitors of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase is also not excluded.*

ОЦЕНКА МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА В ПЛАЗМЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ

*Максимчик Ю.З.¹, Рожко В.А.², Черемисин А.С.¹, Филипович Н.А.¹, Лукиенко Е.П.¹,
Ярец Ю.И.², Семененя И.Н.¹*

¹ГП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь

²ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины
и экологии человека», г. Гомель, Республика Беларусь

Резюме. В настоящей работе сделана оценка микроэлементного статуса плазмы крови пациентов с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), находящихся в эутиреоидном состоянии и при развитии гипотиреоза. Результаты проведенных измерений сравнивали с микроэлементным статусом плазмы крови пациентов без признаков АИТ. Показано, что эутиреоидное состояние пациентов характеризуется тенденцией к повышению уровней железа и молибдена в плазме крови, а развитие гипотиреоза сопровождается значительным снижением содержания йода, селена и цинка. Уровни меди, марганца и кобальта не претерпевали существенных изменений во всех изученных группах.

Введение. Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) представляет собой хроническое воспалительное заболевание щитовидной железы, для которого характерно глубокое взаимодействие генетических факторов с факторами окружающей среды [9]. Увеличение заболеваемости АИТ наблюдается во многих странах, включая Республику Беларусь [16]. Среди множества факторов, вызывающих рост заболеваемости АИТ, особое внимание уделяется микроэлементозам различной этиологии [1]. Как известно, важнейшей особенностью функционирования химических элементов в организме является их взаимодействие одного с другим; часто это взаимодействие проявляется в виде синергических или антагонистических эффектов [2]. Ранее было показано, что поддержание баланса йода и селена в организме может значительно снизить риск заболевания АИТ. Поиск и оценка взаимосвязей других микроэлементов с функциональным состоянием щитовидной железы позволит более точно охарактеризовать метаболические нарушения при АИТ и будет способствовать повышению эффективности их коррекции.

Целью проведенного исследования явилась оценка содержания микроэлементов в плазме крови пациентов с различной степенью проявлений аутоиммунного тиреоидита.

Материалы и методы. Исследовалась плазма крови 197 пациентов, прошедших обследование щитовидной железы в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (г. Гомель). В соответствии с результатами клинико-диагностических тестов пациенты были разделены на три группы для оценки микроэлементного статуса плазмы крови. В первую группу ($n = 101$) были включены пациенты без признаков АИТ (контрольная группа). Вторую группу представляли пациенты ($n = 63$), у которых наблюдалась эутиреоидная фаза АИТ (без нарушения функции щитовидной железы). Третью группу ($n = 33$) составили пациенты с АИТ, перешедшим в гипотиреоидную фазу.

Анализ уровня микроэлементов в плазме крови осуществляли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре NexION 2000 ICP-MS. Основные параметры прибора при проведении измерений указаны в табл. 1.

Таблица 1 — Основные параметры масс-спектрометра при проведении измерений

Параметр	Рабочий диапазон
Мощность генератора	1600 Вт
Транспортирующий поток аргона	0,8–0,95 л·мин ⁻¹
Плазмообразующий поток аргона	16 л·мин ⁻¹
Вспомогательный поток аргона	0,9–1,2 л·мин ⁻¹
Скорость подачи раствора	0,3 мл·мин ⁻¹
Распылитель	MEINHARD® Type C
Распылительная камера	Циклонная распылительная камера с охлаждением до +2 °С
Время подвода образца	60 с
Продолжительность регистрации	100–120 с
Время промывки	120–240 с

В работе использовалась азотная кислота квалификации «хч», дополнительно очищенная методом дистилляции. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду, полученную с помощью деминерализатора серии ULTRA Hydrolab (Польша). Образцы плазмы крови подвергали 20-кратному разведению 1%-м раствором азотной кислоты и проводили измерения.

Полученные данные обрабатывали с помощью статистической программы GraphPad Prism 5, применяя однофакторный дисперсионный анализ. Для проверки условий нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро–Уилка. Результаты исследований представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего арифметического значения.

Результаты исследования и их обсуждение. Современные исследования показывают, что помимо йода и селена, роль которых в синтезе гормонов щитовидной железы очевидна и достаточно хорошо изучена, имеются предпосылки к дополнительному рассмотрению статуса других микроэлементов, необходимых для нормального функционирования щитовидной железы. На сегодняшний день значительное внимание уделяется роли железа, цинка меди, марганца, кобальта и молибдена при тиреоидитах различной степени выраженности, что обусловлено участием данных микроэлементов в ряде важных биохимических процессов, происходящих в организме. Считается, что дефицит или избыточное потребление этих элементов может приводить к нарушению функции щитовидной железы [17].

В табл. 2 представлены результаты проведенного нами сравнительного анализа микроэлементов в плазме крови здоровых людей и пациентов с выявленными признаками аутоиммунного тиреоидита.

Таблица 2 — Содержание микроэлементов в плазме крови, мкг/л

Микроэлемент	Контрольная группа	АИТ	
		Эутиреоз	Гипотиреоз
I	105,80±6,62	106,00±7,39	88,64±6,99*
Se	183,00±10,84	180,00±11,61	143,40±8,67*
Fe	1753,0±141,1	1956,0±176,5	1512,0±116,7
Cu	687,3±34,8	678,3±40,2	654,1±57,5
Zn	552,9±27,1	572,7±36,0	456,0±25,7 [▲]
Mn	2,27±0,16	2,37±0,20	2,03±0,27
Co	0,366±0,024	0,413±0,028	0,335±0,022
Mo	0,752±0,075	1,008±0,132	0,831±0,082

* $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, [▲] $p < 0,05$ по отношению к группе «Эутиреоз»

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что наиболее подвержены изменениям микроэлементного статуса организма пациенты с выявленным гипотиреозом. При этом у них наблюдается статистически значимое снижение уровней йода и селена в плазме крови по сравнению с контрольной группой, в то время как в группе пациентов с АИТ в эутиреоидной фазе такого различия не обнаружено.

Йод и селен относятся к первостепенно значимым микроэлементам, требующимся для продукции гормонов щитовидной железы. В то же время показано, что данные элементы являются ключевыми при развитии АИТ. Избыточное потребление йода способно приводить к увеличению инфильтрации тканей щитовидной железы Т-хелперами, при этом подавляя дифференцировку регуляторных Т-лимфоцитов. Данные изменения способствуют инициации апоптотических процессов в тиреоцитах, что приводит к разрушению паренхимы щитовидной железы [7]. Селеновый статус является важным для выполнения широкого спектра биохимических процессов, однако в рамках рассматриваемых нарушений функции щитовидной железы наибольший интерес представляет роль селена как компонента дейодиназ [4]. Различные изоформы дейодиназ катализируют удаление остатка йода с внешнего или внутреннего кольца молекулы тироксина, приводя к образованию либо активной, либо инактивированной формы трийодтиронина. Нарушение метаболизма гормонов щитовидной железы на этапе их активации/инактивации может в значительной степени определять исход заболевания при расстройствах функции щитовидной железы [4]. В совокупности можно отметить, что обнаруженные нами изменения являются очередным подтверждением участия йода и селена в процессах развития АИТ.

Анализ содержания железа в плазме крови пациентов выявил тенденцию к снижению данного показателя при развитии гипотиреоза, в то время как в эутиреоидной фазе наблюдаемые изменения носят противоположный характер.

Железо является компонентом гема, выступающего в качестве простетической группы в составе фермента тиреопероксидазы [6, 11]. Активация тиреопероксидазы происходит на поверхности тиреоцитов во время связывания апоформы фермента с простетической группой [15]. Эти данные указывают на тесную взаимосвязь метаболизма железа в организме с синтезом тиреоидных гормонов. Существует ряд рекомендаций о необходимости оценки уровня железа в организме у пациентов, страдающих нарушением функции щитовидной железы. Это обусловлено тем, что снижение уровней железа в организме может указывать на развитие целиакии или аутоиммунного гастрита, которые считаются коморбидными заболеваниями при развитии АИТ [15].

Нами обнаружено снижение содержания цинка у пациентов с выявленным гипотиреозом. Данные изменения не касались группы АИТ с эутиреоидным статусом. Цинк может оказывать влияние на функцию гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, взаимодействуя с ее компонентами на всех уровнях организации. В частности, было показано, что недостаток цинка способен приводить к снижению продукции тиреотропин-релизинг-гормона [20], а следовательно, к уменьшению уровней тиреотропного гормона, тироксина и трийодтиронина [19]. При участии цинка происходит превращение тироксина в трийодтиронин [12]. Кроме того, цинк оказывает влияние на процесс связывания трийодтиронина с ядерным рецептором и является необходимым компонентом связывания ядерного рецептора с регуляторными областями ДНК [3]. В литературе описаны случаи нарушения функции щитовидной железы при дефиците цинка [8], причем показано, что гипотиреоз способен приводить к недостатку цинка в организме, а недостаток цинка может вызывать гипотиреоз [14].

Оценка уровней меди и марганца не выявила существенных изменений во всех группах обследованных пациентов. Следует однако отметить, что каждый из указанных выше микроэлементов участвует в регуляции важных биохимических процессов. Медь выступает в качестве кофактора тирозиназы — фермента, ответственного за биосинтез тирозина. Тирозин является одной из ключевых аминокислот, входящих в состав тиреоглобулина, который, в свою очередь, участвует в синтезе тиреоидных гормонов [13]. Марганец является важным микронутриентом для организма человека, однако его содержание характеризуется следовыми количествами. При этом избыточное поступление марганца в организм способно вызывать токсический эффект. Наиболее изучена роль марганца в качестве компонента марганецсодержащего фермента супероксиддисмутазы (Mn-SOD). Влияние марганца на функцию щитовидной железы является в значительной степени опосредованным. Однако имеются данные о том, что избыток марганца может затрагивать продукцию дофамина, который является важным нейромедиатором, способным оказывать модулирующий эффект на секрецию тиреотропного гормона [18].

Нами была проведена оценка уровней кобальта в плазме крови пациентов при развитии АИТ. Следует отметить, что влияние кобальта на функцию щитовидной железы длительное время оставалось неясным. Ранее было показано [5], что введение кобальта сопровождалось образованием гиперпластического зоба и развитием гипотиреоза. Функциональная активность щитовидной железы при этом значительно снижалась. Отмена кобальта приводила к восстановлению показателей функции щитовидной железы у пациентов, находящихся под наблюдением в клинике. Подобный эффект наблюдался и в эксперименте над животными. Было выдвинуто предположение, что кобальт способен ингибировать поглощение йода щитовидной железой, а также оказывать влияние на его переход в органическую форму [5]. Наши наблюдения показали, что при АИТ уровень кобальта в плазме крови не отличался от уровней контрольной группы.

В нашем исследовании наблюдается незначительная тенденция к увеличению молибдена в плазме крови пациентов с АИТ при эутиреозе. При гипотиреозе данный показатель сопоставим со значениями контрольной группы. Следует отметить, что влияние избытка или недостатка молибдена на функцию щитовидной железы изучено недостаточно. Проведенное ранее [10] гистологическое исследование щитовидной железы крыс, получавших молибден, выявило признаки трансформации фолликулярных клеток при сравнении с контрольными животными. Выявленные изменения сопровождались снижением содержания йода в тиреоцитах. Таким образом, требуется дополнительное изучение роли молибдена при нарушениях функции щитовидной железы.

Заключение. Результаты проведенного исследования подтверждают участие йода и селена в развитии аутоиммунного тиреоидита. Уровень железа незначительно варьировал во всех изученных группах, однако сохранялась тенденция к его снижению у пациентов с гипотиреозом. Нами показано значительное снижение содержания цинка у пациентов с АИТ, перешедшим в гипотиреоидную фазу. Нарушение метаболизма цинка при гипотиреозе может указывать на дополнительные осложнения протекания заболевания. Обнаружена тенденция к увеличению содержания молибдена в эутиреоидной фазе у исследуемых с аутоиммунным тиреоидитом. Содержание меди не изменялось у пациентов с различной формой АИТ при сравнении уровней данного показателя со здоровыми людьми. Подобным образом, нами не обнаружено значительных изменений уровней марганца и кобальта в плазме крови обследованных. В заключение следует отметить, что поддержание необходимого уровня селена в организме и нормального

уровня выделяемого с мочой йода следует рассматривать обязательным условием контроля течения тиреоидита, поскольку это может играть важную роль в предупреждении болезни. Полученные результаты предполагают дальнейшее изучение роли цинка в развитии патологии щитовидной железы.

Список литературы

1. Скальный, А. В. Микроэлементозы человека (диагностика, лечение) / А. В. Скальный. — М.: Изд. КМК, 1999. — 96 с.
2. Скальный, А. В. Биоэлементы в медицине / А. В. Скальный, И. А. Рудаков. — М.: Издательский дом «ОНИКС 21 век»: Мир, 2004. — 272 с.
3. Anselmet, A. Triiodothyronine nuclear receptor. Role of histones and DNA in hormone binding / A. Anselmet, J. Bismuth, J. Torresani // *Biochim Biophys Acta*. — 1983. — Vol. 739, №3, — P. 291–300.
4. Bianco, A. C. The deiodinase trio and thyroid hormone signaling / A. C. Bianco, R. R da Conceição // *Methods. Mol. Biol.* — 2018. — Vol. 1801. — P. 67–83.
5. Cobalt and thyroid function / J. P. Kriss [et al.] // *JAMA*. — 1955. — Vol. 159, №7. — P. 708.
6. Dunn, J. T. Update on intrathyroidal iodine metabolism / J. T. Dunn, A. D. Dunn // *Thyroid*. — 2001. — Vol. 11, №5. — P. 407–414.
7. Duntas, L. H. The role of iodine and selenium in autoimmune thyroiditis / L. H. Duntas // *Horm. Metab. Res.* — 2015. — Vol. 47, №10. — P. 721–726.
8. Effects of zinc deficiency on thyroid function / J. W. Olivier [et al.] // *Drug. Nutr. Interact.* — 1987. — Vol. 5, №2. — P. 113–124.
9. Hashimotos' thyroiditis: epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy / F. Ragusa [et al.] // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2019. — Vol. 33, №6. — P. 101–367.
10. Intake of boron, cadmium, and molybdenum enhances rat thyroid cell transformation / E. Luca [et al.] // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* — 2017. — №36. — P. 73.
11. Iron deficiency anemia reduces thyroid peroxidase activity in rats / S. Y. Hess [et al.] // *J. Nutr.* — 2002. — Vol. 132. — P. 1951–1955.
12. Processing of TRH precursor peptides in rat brain and pituitary is zinc dependent / A. E. Pekary [et al.] // *Peptides*. — 1991 — Vol. 12, №5. — P. 1025–1032.
13. Reductions in tyrosine levels are associated with thyroid hormone and catecholamine disturbances in sepsis / W. Khaliq [et al.] // *Intensive Care Med. Exp.* — 2015. — Vol. 3 (Suppl 1) — P. A686.
14. Renal handling of zinc in insulin-dependent diabetes mellitus patients / J. Brandão-Neto [et al.] // *Biometals*. — 2001. — Vol. 14, №1. — P. 75–80.
15. Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding / L. Fayadat [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, №15. — P. 10533–10538.
16. Primary incidence of autoimmune tyroiditis in the republic of Belarus and radiation factor / V. Rozhko [et al.] // *Meditinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost*. — 2020. — Vol. 65, №2. — P. 27–33.
17. Selenium and iodine in autoimmune thyroiditis / E. Guastamacchia [et al.] // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. — 2015. — Vol. 15, №4. — P. 288–292.
18. Soldin, O. P. Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: potential links / O. P. Soldin, M. Aschner // *Neurotoxicology*. — 2007. — Vol. 28, №5. — P. 951–956.
19. Thyroid hormone modulation of thyrotrophin-releasing hormone (TRH) and TRH-Gly levels in the male rat reproductive system / A. E Pekary [et al.] // *J. Endocrinol.* — 1987. — Vol. 114, №2. — P. 271–277.
20. Zinc deficiency, chronic starvation, and hypothalamic-pituitary-thyroid function / J. E. Morley [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1980. — Vol. 33, №8. — P. 1767–1770.

ESTIMATION OF BLOOD PLASMA MICROELEMENTS IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS

*Maksimchyk Yu.Z.¹, Rozhko V.A.², Cheremisin A.S.¹, Filipovich N.A.¹, Lukienko Ye.P.¹,
Yarets Yu.I.², Semenenya I.N.¹*

*¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
of National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus*

*²Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology,
Gomel, Republic of Belarus*

Summary. *In the present study, two groups of patients with autoimmune thyroiditis (AIT) were examined and determination of trace elements in blood plasma of patients was carried out. The results obtained were compared to those for a group of patients without AIT. It was shown that the patients in euthyroid state were characterized with the slight increase in the blood plasma levels of iron and molybdenum. The development of hypothyroidism was found to be associated with the significant decrease in blood plasma levels of iodine, selenium and zinc. Copper, manganese and cobalt levels did not change significantly in all groups studied.*

D-ВИТАМИНЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Мойсеёнок А.Г.¹, Максимчик Ю.З.¹, Мойсеёнок Е.А.², Хвесько И.С.¹

¹Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь;

²Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Республика Беларусь

Резюме. Обзор данных эпидемиологических исследований, касающихся ассоциации заболеваемости COVID-19 и распространенностью витамин D-дефицитных состояний в различных странах, указывающих на зависимость состояния и течения вирусной патологии от D-витаминного статуса, включая показатели коморбидности и смертности пациентов. На основании данных биохимических и молекулярно-биологических исследований обосновывается защитная роль кальциферолов в поддержании иммунной защиты организма. Механизмы воздействия гормональной формы витамина D определены как: 1) снижение феномена или компонентов «цитокинового шторма» и выброса хемокинов; 2) регуляция ренин-ангиотензивной системы; 3) модулирование активности нейтрофилов; 4) стабилизация альвеолярно-эпителиального барьера; 5) стимуляция процесса эпителизации. В действии протективных механизмов критическим моментом является доступность кальцидиола.

Указывается на проведение серии рандомизированных контролируемых исследований, оценивающих эффективность различных дозировок витамина D у пациентов с высоким риском COVID-19, в том числе в составе комплексной терапии и профилактики вирусной инфекции.

Сообщается об издании сборника научных работ «Питание и обмен веществ», выпуск 5 (издательство «Беларусская наука»), представляющего коллективную монографию по проблеме предупреждения и диагностики дефицита витамина D.

Наступление пандемии коронавирусной инфекции продолжается. Антирекорды заболеваемости зафиксированы и в нашей стране. Обнадуживает начало системной вакцинации групп повышенного риска, хотя этиопатогенетическое лечение и развитие фатальных осложнений по причине острого респираторного дистресс-синдрома и тромбоэмболических осложнений вызывают глубокую тревогу. Предприняты различные попытки выяснения особенностей и закономерностей вирусной пандемии, патогенеза заболевания, причинных факторов морбидности и летальности пациентов, их взаимосвязи со средой обитания человека. В качестве примера может быть приведен обширный статический анализ факторов риска, способствующих распространению коронавирусной инфекции на начальном этапе, опубликованный 7 мая 2020 г. [23]. Научно-медицинское видение проблемы коронавирусной инфекции, первоначально освещенное китайскими врачами, отражено в публикациях эпидемиологов, вирусологов и интернистов ряда стран, в том числе в Беларуси в обзоре Н.П. Митьковской и соавторов [2].

В разгаре пандемии издан сборник научных работ «Питание и обмен веществ» (Вып. 5), отражающий мнение ведущих экспертов по проблеме витамина D, проявляющегося в пандемии его дефицита в питании и сочетающегося с вирусными заболеваниями [4]. Цитируемое издание,

в котором мы являемся соавторами статей, ставит своей задачей предоставление нового видения о функциях витамина D и его производных, в первую очередь имеющих отношение к формированию и регуляции иммунной системы, обеспечивающих противовоспалительную и противовирусную защиту организма.

В 2007–2008 гг. И. Шенфельдом предложена теория, обосновывающая иммуносупрессорную и иммуномодулирующую роль витамина D, ограничивающую развитие иммунного ответа путем модуляции Т-хелперов 1-го и 17-го подтипов и ведущего к росту дифференцировки и активности Т-хелперов 2-го типа. Этим объясняются витамин D-ассоциированные эффекты усиления противоинфекционного и антипаразитарного иммунитета и ослабление аутоиммунитета [9, 30]. Это активно эксплуатируется клинической медициной путем назначения препаратов витамина D при аутоиммунном тиреоидите Хасимото [3], ревматоидном артрите [39], рассеянном склерозе [36].

В изучении новых функций кальциферолов (витамин D и производные этого стероида) было обращено внимание на их способность воздействовать на продукцию цитокинов (полипептидов клеточного происхождения) в периферических мононуклеарных клетках крови. Цитокины, как известно, продуцируются различными типами клеток, имеют множественные мишени и функции. Лимфоциты типа CD4⁺ разделяются на Т-хелперы типа 1 (Th1) и типа 2 (Th2). Последние отличаются способностью секретировать противовоспалительные цитокины типа IL-2 и опосредованно (через образование T0 и последующую генерацию Th1 Th2) целую гамму цитокинов и хемокинов, в частности IFN- γ [2]. Еще в 2002 г. в обстоятельном исследовании эффекта гормональной формы витамина D (кальцитриола) на продукцию цитокинов мононуклеарными клетками крови и алергенспецифичными Th-клетками, стимулированными алергеном или антителами выявлено ингибирование продукции IL-2, IFN- γ , IL-12, а также процент клеток CD4⁺, содержащих интрацитоплазматический IL-2 и IFN- γ . Эффект кальцитриола наблюдался в концентрации 10⁻⁷–10⁻⁹, был очевиден в отношении секреции IL-10 и IL-5, но не IL-4. Кроме того, уменьшалась секреция IL-1, TNF- α и MG-CSF нормальными клетками. Ингибирующий эффект кальцитриола был получен на Th1 клонах (падение секреции IL-2 и IFN- γ) и Th2 клонах (IL-4). Авторы рекомендуют применение производных 1 α , 25-дигидроксивитамина D₃ в иммуносупрессивной терапии [28]. Это только небольшой фрагмент обстоятельно разработанной с начала 90-х годов прошлого века темы о роли гормональной формы витамина D в иммунологии, как видно из цитируемых ниже избранных публикаций [22, 11, 15].

С профилактической точки зрения важное значение приобрело обобщение 25 рандомизированных контролируемых наблюдений с участием более 11 тысяч пациентов, которые принимали витамин D и характеризовались существенным снижением острых респираторных заболеваний. Этот эффект был выражен при уровне 25(OH)D в крови < 25 нмоль/л и в меньшей степени, при уровне >25 нмоль/л [38]. Схожие результаты были получены при заболеваемости гриппом [27], осложненные формы которого характеризуются повышенной концентрацией в крови цитокинов IL-1 и IL-6, т. е. синдромом «цитокинового шторма», аналогичного вызываемому COVID-19 [14, 19].

Первый опыт применения иммунодепрессивного препарата тоцилизумаба (*tocilizumab*) оказался обнадеживающим для ведения пациентов с тяжелыми легочными проявлениями COVID-19 как лекарственного средства блокирующего рецепторы IL-6. Исходя из этих данных и распространенности и всесезонности D-витаминного дефицита [8]. M. Silberstein было рекомендовано расширенное назначение витамина D, в том числе для замены тоцилизумаба (представлено в редакцию в форме письма от 27.03.2020, принято 21.04.2020) [31]. Вероятно, в этом

случае «антицитокиновый» механизм действия препарата и витамина D мог быть различным, хотя сходные его элементы могли проявиться.

Практически одновременно появилась онлайн-публикация и журнальная статья о возможной роли витамина D в предупреждении инфицирования коронавирусом и смертности обусловленной COVID-19. Авторы (P.C. Ilie, S. Steganescu, L. Smith) [17] сопоставили данные изучения статуса витамина D в европейских странах и сведения о числе случаев заболеваемости и смертности вследствие патологии COVID-19. Была установлена негативная корреляция заболеваемости и смертности с уровнем статуса витамина D (оценка по биомаркеру со средней величиной 56 нмоль/л), в частности, в случаях практически низких значений (42,5–50 нмоль/л). В качестве «устойчивых» к COVID-19 стран указано население Финляндии и Словакии, уровень витамина D у которых в среднем составил 67,7–81,5 нмоль/л [17]. Обращено внимание на чрезвычайно низкий уровень обеспеченности витамином D у пожилых и престарелых людей, характеризующихся уровнем биомаркера < 25 нмоль/л по причине низкой солнечной инсоляции и снижения синтеза витамина в коже и не потребляющих в диете обогащенные витамином D продукты, как это распространено, например, в Финляндии. Профилактический эффект кальциферола связывается с увеличением защитных свойств организма в случае инфекции SARS-Cov-2. Помимо свойств кальцитриола предупреждать секрецию провоспалительных цитокинов макрофагами указывается на модулирование свойств клеточного рецептора ACE, посредством которого SARS-Cov-2 проникает в клеточные системы, но, как известно, падение белка ACE2 в легочной ткани ослабляет трансформацию ангиотензина II в пептиды, обладающими защитными эффектами в легочной ткани. Указанное ослабление синтеза защитных пептидов характерно в старом организме и может быть связано с ростом пневмоний и смертности от COVID-19 в популяции пожилых и престарелых мужчин [6].

Онлайн-публикация Tibi Puiu от 05.05.2020 представляет результаты и мнение ученых [25], заостряя внимание на критическом уровне витамина D у пожилых и престарелых людей и необходимости ежедневного приема не менее 800 МЕ витамина D [25]. Есть основание полагать, что лечебно-профилактические эффекты кальциферолов достигаются при разовой дозировке превышающей 2000 МЕ [4, 5].

9 апреля 2020 г. были опубликованы результаты ретроспективного многоцентрового исследования 212 пациентов инфицированных SARS-COV-2, у которых ранее контролировался D-витаминный статус в среднем установленный с медианой 23,8 нг/мл (при нормальной обеспеченности > 30 нг/мл). Особенно низкие величины выявлены в критических ситуациях и в целом статус витамина D ассоциировался со степенью клинических проявлений. Автор цитирует более раннее сообщение *Braiman* о возможной роли D-витаминного дефицита в смертельных осложнениях течения инфекции COVID-19 [7].

Другое исследование на 780 пациентах, проживающих в регионе Юго-Восточной Азии, подтвердило тесную взаимосвязь течения коронавирусной инфекции и D-витаминного статуса. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1 — Характеристика состояния и течения COVID-19 в зависимости от D-витаминного статуса, верифицированного по уровню биомаркера [24]

Характеристика пациентов	Группы D-витаминного статуса		
	< 20 нг/мл	20–30 нг/мл	> 30 нг/мл
Содержание витамина D	18,2 ± 0,6	26,7 ± 1,3	32,2 ± 1,2
Число пациентов	179	213	388

Характеристика пациентов	Группы D-витаминного статуса		
	< 20 нг/мл	20–30 нг/мл	> 30 нг/мл
Возраст пациентов	66,9 ± 13,8	62,9 ± 14,7	46,6 ± 12,6
Коморбидность, %	80,0	73,8	18,8
Смертность, %	98,9	87,8	4,1
Активность, %	1,1	12,2	95,9

Оценка фактора риска (OR) летального исхода оказалась у пациентов в возрасте ≥ 50 лет — 10,45, у мужчин — 5,73, с наличием коморбидности — 11,24, с недостаточностью витамина D — 12,55, с дефицитом витамина D — 19,12. При этом показатель оценки шансов (ОШ) смертного исхода ассоциировался в высокой степени (с учетом возраста, пола и коморбидности) с наличием недостаточности витамина D — 7,63 и дефицита витамина — 10,12 при соотношении с нормальным уровнем витамина в крови пациентов [24].

Каковы же возможные механизмы эффективности кальцитриола, как известно являющиеся плеiotропными и обеспечивающие, вне всякого сомнения, гомеостаз иммунной системы организма, предупреждение паразитарной, бактериальной и вирусной патологии. Является аксиомой, универсальная способность клеток иммунной системы экспрессировать рецептор кальцитриола (VDR) и, соответственно, большинство цитокинов, инициирующих или регулирующих иммунные клетки, подвержены воздействию гормональной формы витамина D. В сущности кальцитриол активирует нативную систему иммунной защиты снижая потенциал приобретенной иммунной защиты [4, 9, 3, 40]. Обеспечивается своеобразный баланс витамин D-зависимой регуляции, поскольку антиген-презентирующие и моноцитарные клетки могут экспрессировать CYP27B1 — ключевой фермент образования кальцитриола для локальной ауто/паракринной регуляции иммунного ответа. Нарушение экспрессии VDR и CYP27B1 в эпителии легких, в частности, может быть одной из причин тропности COVID-19 к легочной ткани, провоцируя развитие пневмонита и последующего его осложненного течения [29]. Возникновение и тяжесть острого респираторного дистресс-синдрома (*Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS*), (ОРДС) [16, 28] могут предопределять полиорганную дисфункцию и угрозу смертельных исходов через 3–4 недели с момента проявления симптоматики. Трудности лечения ОРДС в быстротекущей острой фазе (фазе пневмонии) и борьбы с развивающейся дыхательной недостаточностью [1] диктуют необходимость усиления первичной профилактики и предупреждения собственно ОРДС в фазе «цитокинового шторма», проявляющегося неконтролируемым высвобождением в кровообращение провоспалительный цитокинов (IFN- α и γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-33, TNF- α , TGF β и др.) и хемокинов (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 и др. [11]. Это иммунопатологическое явление является сходным при инфекциях SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV [26], а концентрация и соотношение цитокинов являются фактором тяжести заболевания, вследствие чрезмерной активации и привлечения нейтрофилов, Т-лимфоцитов и NK-клеток в интерстициальное и альвеолярное пространство с нарушением эндотелиально-эпителиального барьера.

Другим важным обстоятельством возникновения вирусного инфицирования и его генерализации является активация ренин-ангиотензиновой системы, так как ангиотензин-превращающий фермент ACE2, экспрессируемый альвеолярными эпителиальными клетками типа AC II рассматриваются как рецепторная мишень проникновения SARS-CoV-2 в легочный эпителий. Утрата защитных свойств легочной ткани с участием пептидных про-

дуктов гидролиза ACE2 наряду с гиперпродукцией цитокинов и хемокинов приводят к распространенному воспалительному процессу с активацией и притоком нейтрофилов и макрофагов в альвеолярное пространство вследствие разрушения альвеолярно-эпителиального барьера. Возникает переполнение альвеолярного пространства активированными нейтрофилами, цитокинами/хемокинами и высокобелковым экссудатом. ОРДС и чрезмерное системное воспаление обуславливают гипоксию и эндотелиит, протромботическое состояние и дыхательную недостаточность. Обращается внимание на потенциальный риск фиброза с нарушением функции легких [13].

Потенциальная роль системы кальцитриол/VDR в повышении эффективности иммунной защиты вытекает из данных, полученных при моделировании ОРДС с использованием бактериального липополисахарида. Эффекты кальцитриола были определены как: 1) снижение феномена или компонентов «цитокинового шторма» и выброса хемокинов; 2) регуляция ренин-ангиотензиновой системы; 3) модулирование активности нейтрофилов; 4) стабилизация альвеолярно-эпителиального барьера; 5) стимуляция процесса эпителизации [10, 34]. В обобщенном виде механизмы действия кальцитриола и его предшественника кальцидиола (кальцидиола) представлены на рис. 1 [10].

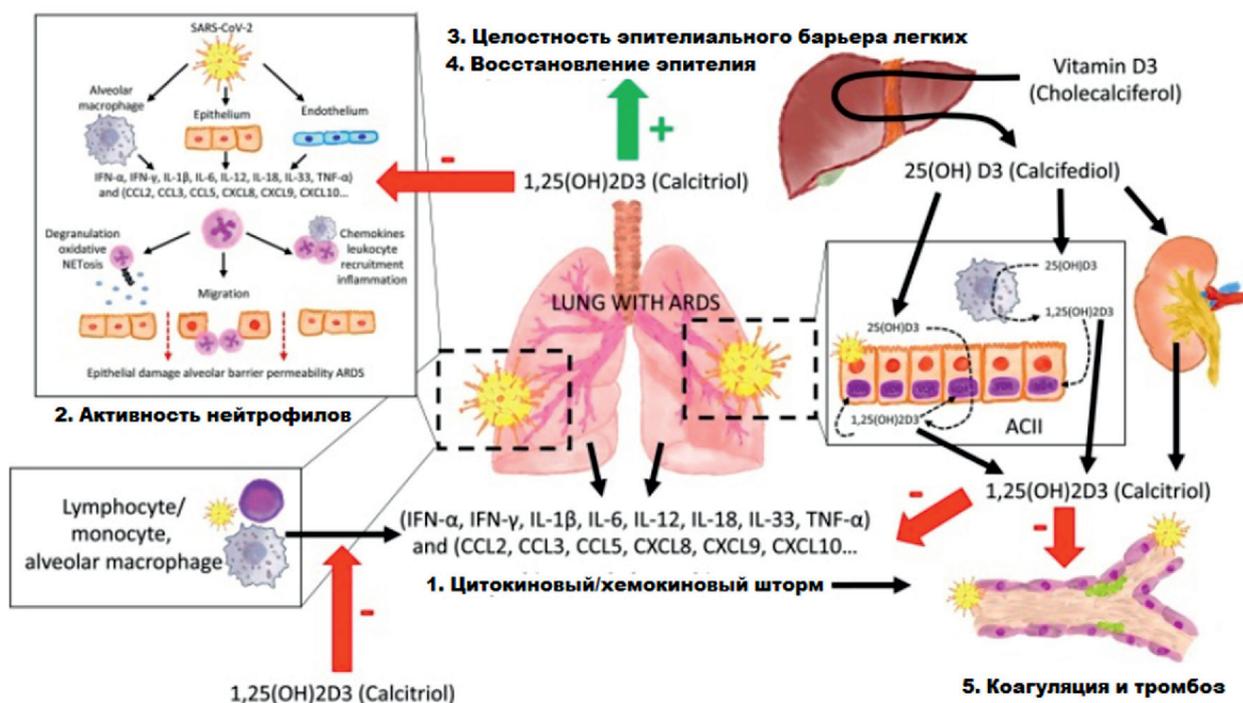


Рисунок 1 – Механизм действия кальцитриола и его предшественника кальцидиола на компоненты иммунной системы организма в патогенезе COVID-19

Можно полагать, что потенциал системы кальцитриол/VDR посредством эндокринного и ауто/паракринного действия может предупреждать возникновение и даже урежение проявлений ОРДС вследствие адекватного экспрессирования в кубовидных альвеолярных клетках АСII, в моноцитах/макрофагах и активированных лимфоцитах. **Критическим моментом является доступность кальцидиола.** Равным образом это относится к патогенетическому механизму, опосредованному ренин-ангиотензиновой системой, для которой кальцитриол является мощным негативным регулятором, ингибирующим ренин и ACE/AngII/AT1R и восстанавливающим потенциал пути ACE2/Ang-(1-7), обеспечивающего защиту легоч-

ного эпителия [26, 33]. Более подробно этот механизм рассматривается в обзорной части работы [26].

Следует особо указать на недавно выявленную роль VDR-опосредованного сигналинга в деактивировании белка Skp2, который продуцируется коронавирусом COVID-19 для обеспечения репликации и блокады аутофагии через ингибирование белка *Beclin 1*. Кальцитриол, посредством активации VDR, способствует процессу аутофагии поддерживая адекватный клеточный уровень белка *Beclin 1* [16]. Ауто- и паракринные эффекты кальцитриола проявляются в клетках альвеолярного покрытия в увеличении экспрессии антимикробного фактора пептидной природы – кателицидина, что доказано на модели вирусной инфекции [35]. В упомянутых альвеолярных клетках продемонстрирована активность кальцитриола в стимуляции фактора сурфактанта и генов плотного соединения [37]. Недавно проведенные исследования в ГрГМУ показали недостаточность витамина D как один из предикторов формирования бронхо-легочной дисплазии у недоношенных детей, получающих сурфактантную терапию [4]. Результаты упомянутых, а также некоторых иных наблюдений и экспериментов [26] обосновывают целесообразность фармакологической активации VDR для увеличения терапевтического потенциала в базовой терапии ОРДС и вирусного пневмонита.

Защитные метаболические эффекты кальциферолов характерны для системы гемостаза в доклинических исследованиях, а данные клинической биохимии указывают на связь низкого уровня 25(OH)D с развитием венозных тромбозных осложнений [37]. Механизмы антитромботической активности витамина D связывают с блокадой экспрессии тканевого фактора (TF) и его прокоагулянтной активности и активацией фактора TFPI, ассоциированного с факторами свертывания крови VIa и Ха [20].

Плейотропные эффекты витамина D и его гормональной формы кальцитриола проявляются на чрезвычайно широком спектре генов (на сегодняшний момент > 160) и это является серьезным ограничением его расширенного применения. Это не относится к традиционной эксплуатации остеотропных функций витамина и относительно новым (но уже признанным) показаниям к его применению (ревматоидный артрит, рассеянный склероз и т. д.). По разным данным ≥ 50 % населения Земли в результате низкого потребления или недостатка солнечной инсоляции характеризуется D-витаминной недостаточностью. Эта доля резко возрастает среди лиц пожилого и престарелого возраста и, как указано выше, составляют группу риска фатального течения ОРДС.

Реальное применение витамина D в курации пациентов с COVID-19, его дозировки, схемы применения и последствия находятся в стадии апробирования [18, 32]. Естественно, возникает вопрос о соотношении схем солнечной инсоляции для активизации синтеза витамина D в коже, применения аналогов витамина и потребления D-обогащенных продуктов. Это особенно актуально для населения Беларуси, не обладающего в силу географического расположения ресурсом для активизации УФ-инсоляции и ограниченными возможностями в альтернативном потреблении кальциферолов с пищей. Фактически речь может идти об инициировании межведомственной программы ликвидации D-витаминной недостаточности, о необходимости которой уже неоднократно высказывались ученые и медицинская общественность.

Конкретные ответы на значимость D-витаминного фактора и терапевтического механизма VDR-активации для профилактики и лечения COVID-19 могут дать текущие рандомизированные контролируемые проекты. Согласно базе данных NIH Trialnet [26] особый интерес вызывают следующие:

1. Витамин D в профилактике и лечении COVID-19 (NCT04334005) – рандомизированное, двойное слепое исследование с апреля по июнь 2020 г., в котором пациенты получают витамин D (25000 МЕ).

2. Снижение риска осложнений при назначении аспирина и витамина D (NCT04363840) — рандомизированное исследование с дозировкой витамина D в 50000 МЕ на протяжении двух недель в период с мая по декабрь 2020 г.

3. Пилотное исследование комплексного применения гидроксихлорохина, витаминов С и D, цинка на 600 пациентах с апреля по июль 2020 г.

4. Витамин D₃ в выживании пожилых пациентов, инфицированных COVID-19 (NCT04351490), рандомизированное исследование на 3140 пациентах с назначением глюконата цинка дополнительно к 25(ОН)-холекальциферолу в дозировке 2000 МЕ на протяжении 2 месяцев в период с апреля до июля 2020 г. Оценивается выживаемость субъектов при первоначальном бессимптомном состоянии здоровья.

5. Эффект дозы витамина D у пациентов с высоким риском COVID-19, многоцентровое рандомизированное, контролируемое испытание (NCT04344041) на 260 пациентах, получающих 50000 МЕ или 400000 МЕ в составе комплексной терапии в период с апреля по июль 2020 г.

Уровень биохимических и молекулярно-биологических знаний по кальциферолам непрерывно возрастает. Помимо кальцитриола биологические эффекты свойственны его метаболитам, а их реализация детерминируется полиморфизмом ключевых ферментов метаболизма витамина-гормона: 7-дегидрохолестеринредуктазы, CYP2R1 и CYP24A1, а также метаболитов функционирования VDR [4, 5, 10]. Это обуславливает значительные проблемы в изучении и понимании потенциала противовирусной активности системы кальциферолов.

Приведенные выше проекты и ряд других продемонстрируют реальные возможности и обоснованность применения витамина D и технологии VDR-активации для профилактики и успешного лечения коронавирусной инфекции, но судя по имеющимся данным молекулярно-биологических исследований, доклиническим и частично клиническим наблюдениям, а также результатам эпидемиологических данных, необходимость нормализации D-витаминного статуса в современных условиях пандемии, безусловно необходима для упрочения иммунной системы защиты организма.

Число публикаций по рассматриваемой проблеме нарастает и витамин D внесен в число потенциальных терапевтических средств при инфицировании COVID 19 [21], хотя все варианты лечения или вакцинации находятся на стадии оценки. Реализация D-зависимых противовирусных механизмов, по нашему мнению, во многом зависит от генетических детерминантов витаминного статуса организма [4].

Список литературы

1. Коронавирусная инфекция COVID-19 (обзор международных научных данных) / Н.П. Митьковская [и др.] // Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски. — 2020. — Т. 4, № 1. — С. 784–815.

2. Новиков, Д. К. Клиническая иммунология : учеб. пособие / Д. К. Новиков, П. Д. Новиков. — Витебск : ВГМУ, 2006. — 392 с.

3. Роль гипокальциемии и витамина D₃ в патогенезе фобий при хроническом аутоиммунном тиреоидите Хасимото. / Ю. И. Строев [и др.] // Педиатр. — 2017. — Т. 8, Вып. 4. — С. 39–42.

4. Хвесько И.С. Генетические детерминанты статуса витамина D и его эффективности / И.С. Хвесько, А.Г. Мойсеёнок // Питание и обмен веществ: сб. научных статей. — Вып. 5; науч. ред. А.Г. Мойсеёнок. — Минск: Беларуская навука, 2020. — С. 287–300.
5. Якубова, Л. В. Обеспеченность организма витамином D и сердечно-сосудистые заболевания / Л. В. Якубова. — Гродно : ГрГМУ, 2018. — 256 с.
6. Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung / X. Xie [et al.] // *Life Sci.* — 2006. — Vol. 78, № 19. — P. 2166–2171.
7. Alipi, M. Vitamin D Supplementation Could Possibly Improve Clinical Outcomes of Patients Infected with Coronavirus-2019 (COVID-19) [Electronic resource] / M. Alipi // SSRN. — Mode of access: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3571484. — Date of access: 16.07.2020.
8. Analysis of 25-hydroxyvitamin D status according to age, gender, and seasonal variation / H.J. Yu [et al.] // *J. Clin. Lab. Anal.* — 2016. — Vol. 30, № 6. — P. 905–911.
9. Autoantibodies — antigen driven or idiotypically induced? Proceedings of the 3rd international scientific and practical conference on Immunophysiology: autoimmunity in health and disease. Contribution to predictive and preventive medicine / eds.: A.B. Poletaev, A.N. Danilov. — Moscow, 2008. — 137 p.
10. Bouillon, R. Genetic and environmental determinants of vitamin D status / R. Bouillon // *Lancet.* — 2010. — Vol. 376, № 9736. — P. 148–149.
11. Cantorna, M. T. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis with a subset of T lymphocytes: A model of multiple sclerosis / M. T. Cantorna, C. Hayes, H. F. DeLuca // *Proc. Soc. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93, № 15. — P. 861–7864.
12. Channappanavar, R. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology / R. Channappanavar, S. Perlman // *Semin. Immunopathol.* — 2017. — Vol. 39, № 5. — P. 529–539.
13. Chest CT manifestations of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review / Y. Zheng [et al.] // *Eur Radiol.* — 2020. — P. 1–9.
14. Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. Situation report — 66 [Electronic resource] // WHO. — Mode of access: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>. — Date of access: 16.07.2020.
15. DeLuca, H. F. Vitamin D: its role and use in immunology / H. F. DeLuca, M. T. Cantorna // *FASEBJ.* — 2001. — Vol. 15, № 14. — P. 2579–2585.
16. Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice / Á. F. Fernández [et al.] // *Nature.* — 2018. — Vol. 558, № 7708. — P. 136–140.
17. Ilie, P. C. The role of vitamin D in the prevention of coronavirus disease 2019 infection and mortality / P. C. Ilie, S. Stefanescu, L. Smith // *Aging Clin. Exp. Res.* — 2020. — P. 1–4.
18. Impact of vitamin D deficiency on prognosis of patients with novel coronavirus pneumonia (COVID-19) [Electronic resource] // Chinese Clinical Trial Registry. — Mode of access: <http://www.chictr.org.cn/showprojen.aspx?proj=49302>. — Date of access: 16.07.2020.
19. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies / P. Conti [et al.] // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* — 2020. — Vol. 34, № 2. — P. ii: 1.
20. Is there any association between thrombosis and tissue factor pathway inhibitor levels in patients with vitamin D deficiency? / O. Topaloglu [et al.] // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* — 2015. — Vol. 21, № 5. — P. 428–433.
21. Moghadam, S.O. A Review on Currently Available Potential Therapeutic Options for COVID-19 / S.O. Moghadam // *Internat. J. General Med.* — 2020. — Vol. 13. — P. 443–467.
22. Müller, K. Inhibition of human T lymphocyte proliferation and cytokine production by 1.25-dihydroxyvitamin D3. Differential effects on CD45RA+ and CD45RO+ cells / K. Müller, K. Bendtzen // *Autoimmunity.* — 1992. — Vol. 14, № 1. — P. 37–43.

23. Notari, A. COVID-19 transmission risk factors [Electronic resource] / A. Notari, G. Torrieri // medRxiv. — Mode of access: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.08.20095083v1>. — Date of access: 16.07.2020.
24. Patterns of COVID-19 mortality and vitamin D: an Indonesian study [Electronic resource] / P. Raharusuna [et al.] // Emerginova. — Mode of access: <https://ssrn.com/abstract=3585561>. — Date of access: 16.07.2020.
25. Puiu, T. Scientists link vitamin D deficiencies to higher COVID-19 mortality rates [Electronic resource] / T. Puiu // Health & Medicine, News. — Mode of access: <https://www.zmescience.com/science/news-science/scientists-link-vitamin-d-deficiencies-to-higher-covid-19-mortality-rates/> — Date of access: 16.07.2020.
26. Quesada-Gomez, J.M. Vitamin D receptor stimulation to reduce acute respiratory distress syndrome (ARDS) in patients with coronavirus SARS-CoV-2 infections / J.M. Quesada-Gomez, M.E. Castillo, R. Bouillon // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. — 2020. — Vol. 202. — P. 105719.
27. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren / M. Urashima [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. — 2010. — Vol. 91, № 5. P. 1255–1260.
28. Regulation of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells and allergen-specific Th cell clones by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ / X. Rausch-Fan [et al.] // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2002. — Vol. 128, № 1. — P. 33–41.
29. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense / S. Hansdottir [et al.] // J. Immunol. — 2008. — Vol. 181, № 10. — P. 7090–7099.
30. Schoenfeld, Y. To smell autoimmunity: Anti-P-ribosomal autoantibodies, depression, and the olfactory system / Y. Schoenfeld // J. Autoimmunity. — 2007. — Vol. 28, № 2–3. — P. 165–169.
31. Silberstein, M. Vitamin D: A simpler alternative to tocilizumab for trial in COVID-19? / M. Silberstein // Medical Hypotheses. — 2020. — Vol. 140. — P. 109767.
32. The relationship between Vitamin D and novel coronavirus pneumonia (COVID-19) [Electronic resource] // Chinese Clinical Trial Registry. — Mode of access: <http://www.chictr.org.cn/showprojen.aspx?proj=51390>. — Date of access: 16.07.2020.
33. Vitamin D alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulation of the rennin-angiotensin system / J. Xu [et al.] // Mol. Med. Rep. — 2017. — Vol. 16, № 5. — P. 7432–7438.
34. Vitamin D attenuates lung injury via stimulating epithelial repair, reducing epithelial cell apoptosis and inhibits TGF- β induced epithelial to mesenchymal transition / S. Zheng [et al.] // Biochem. Pharmacol. — 2020. — Vol. 177. — P. 113955.
35. Vitamin D decreases respiratory syncytial virus induction of NF- κ B-linked chemokines and cytokines in airway epithelium while maintaining the antiviral state / S. Hansdottir [et al.] // J. Immunol. — 2010. — Vol. 184, № 2. — P. 965–974.
36. Vitamin D for the management of multiple sclerosis / V. A. Jagannath [et al.] // Cochrane Database Syst Rev. — 2018. — № 9. — P. CD008422.
37. Vitamin D receptor deletion leads to the destruction of tight and adherens junctions in lungs / H. Chen [et al.] // Tissue Barriers. — 2018. — Vol. 6, № 4. — P. 1–13.
38. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data / A. R. Martineau [et al.] // Br. Med. J. — 2017. — № 356. — P. i6583.
39. Vitamin D, autoimmune disease and rheumatoid arthritis / S. R. Harrison [et al.] // Calcif. Tissue Int. — 2020 — Vol. 106, № 1. — P. 58–75.
40. Vitamin D's effect on immune function / P.-J. Martens [et al.] // Nutrients. — 2020. — Vol. 12, № 5. — P. 1248.

D-DEPENDENT MECHANISMS OF DEVELOPMENT AND RESISTANCE TO CORONAVIRAL INFECTION

Moiseenok A.G.¹, Maksimchyk Yu.Z.¹, Moiseenok Ye.A.², I.S. Khviasko¹

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds,
NAS of Belarus,*

Grodno, Republic of Belarus;

²*Grodno State Medical University,*

Grodno, Republic of Belarus

Summary. *This article represents a review of epidemiological studies dealing with the association of COVID-19 morbidity with prevalence of vitamin D-deficient states in different countries, which indicates dependence of the state and clinical course of the viral pathology on the vitamin status, including comorbidity and death rates of patients. From the data of biochemical and molecular-biological research, a protective role of calciferols in maintaining of immunodefense of the organism is substantiated. The mechanisms of the vitamin D hormonal form effect are determined as follows: 1) a decrease in the phenomenon and components of “the cytokine storm” and chemokine rush; 2) regulation of the renin-angiotensin system; 3) modulation of neutrophil activity; 4) stabilization of the alveolar-epithelial barrier; 5) stimulation of epithelialization process. Calciferol availability is the crucial moment the action of defense mechanisms.*

It is indicated that a series of randomized control studies assessing the efficacy of varying vitamin D doses, including their application as a constituent of comprehensive treatment and prevention of the viral infection, in patients at high risk of COVID-19 is in progress.

Publication of the collection of articles entitled “Nutrition and Metabolism”, issue 5 (Belaruskaya Navuka Publishers), representing a collective monograph on prevention and diagnostics of vitamin D deficiency is announced.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ БЕРБЕРИНА И ЕГО СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ СТЕАТОГЕПАТИТЕ У КРЫС

*Мороз В.Л., Белоновская Е.Б., Нарута Е.Е., Ерошенко Ю.В.,
Кузьмицкая И.А., Кирко С.Н., Буко В.У.*

*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Продемонстрировано иммуномодулирующее действие берберина и его супрамолекулярного комплекса с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином в модели алкогольного стеатогепатита у крыс. Показано, что введение комплексированной формы берберина, в отличие от монопрепарата, в большей степени восстанавливает функциональную способность клеточных и гуморальных факторов иммунной системы, стимулируя фагоцитарные процессы, нормализуя генерацию активных форм кислорода клетками и активируя общую активность системы компонента.

Введение. Алкогольный стеатогепатит (АСГ) является наиболее серьезной формой алкогольной болезни печени, имеющей прогрессирующее течение и приводящей к развитию фиброза/цирроза печени с развитием фатальных осложнений [8]. Нарушение баланса между синтезом про- и противовоспалительных цитокинов, которые контролируют силу и форму иммунного ответа служит своеобразным сигналом для развития АСГ [2, 5, 7]. Хроническая алкогольная интоксикация приводит к стойкому угнетению показателей естественного иммунитета и значительному понижению иммунологической реактивности организма. Алкогольное поражение печени сопровождается серьезными нарушениями клеточного звена иммунной системы, характеризующимися изменением клеточного состава и функции иммунокомпетентных клеток, синтеза иммуноглобулинов, медиаторов иммунного ответа, а также снижением фагоцитарной активности лейкоцитов крови, усугубляющейся при прогрессировании патологии [1, 3].

Проблема фармакологической коррекции АСГ является актуальной для всего мирового сообщества. Эффективность большинства препаратов, используемых в терапии АСГ, является спорной из-за часто возникающих побочных эффектов. В настоящее время особый интерес представляет использование препаратов природного происхождения. Среди них особое внимание заслуживает берберин.

Берберин представляет собой природный алкалоид изохинолина, получаемый из многих лекарственных растений и широко использующийся в традиционной китайской медицине. Последние фармакологические и клинические исследования выявили положительные эффекты берберина. Установлено, что берберин обладает противовоспалительным, гиполипидемическим, антиоксидантным противоопухолевым, антибактериальным действием [10]. Его действие на иммунную систему достаточно противоречиво. В опытах на животных продемонстрирован иммунодепрессивный эффект, снижая количество лимфоцитов CD3, CD4, CD8. В других исследованиях берберин проявлял иммуномодулирующие свойства [6].

Однако установлено, что при пероральном применении берберин обладает низкой биодоступностью [9]. Поэтому в настоящее время значительное внимание уделяется созданию биологических систем, обеспечивающих доставку лекарственной субстанции к органу-мишени, вследствие чего происходит увеличение фармакологической активности препарата. Особое место в качестве компонента таких систем занимают β -циклодекстрины.

Целью исследования явилось определение влияния берберина и его супрамолекулярного комплекса с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином (2-HP- β -CD) на клеточные и гуморальные показатели иммунной системы при АСГ у крыс.

Материалы и методы исследования. Опыты проведены на крысах-самцах линии «Wistar» массой 230–250 г в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также с учетом всех требований «Всемирного общества защиты животных (WSPA)» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (18.03.1986, пересмотр 02.12.2005, Страсбург) и Директивы 86/609/ЕЕС «Защита животных, используемых в научных целях» (в редакции от 05.05.2009, Страсбург). Алкогольный стеатогепатит у крыс индуцировали путем внутрижелудочного (в/ж) введения 30%-ного раствора этанола на фоне высокожирового (32 % жира по калорийности) рациона (ВЖР) в течение 8 недель. Экспериментальных животных разделили на следующие группы (N = 8): 1-я группа — контрольная, содержащаяся на стандартном рационе вивария; 2-я — АСГ+ВЖР; 3-я — АСГ+ВЖР и берберин в дозе 100 мг/кг (водный раствор, *ex tempore*) (Berberine chloride hydrate, Sigma-Aldrich, USA); 4-я — АСГ+ВЖР и супрамолекулярный комплекс берберина с 2-HP- β -CD (CycloLab R@D Ltd, Budapest). Для приготовления водного раствора комплекса его компоненты — берберин и 2-HP- β -CD растворяли в воде при перемешивании и подогреве (молярное соотношение 1:1). Препараты вводили ежедневно, в/ж на протяжении последних 4 недель опыта. Спустя сутки после введения исследуемых субстанций животных декапитировали и проводили забор крови для получения сыворотки, а также образцы ткани печени для гистологического анализа.

Оценку функционально-метаболического состояния полиморфноядерных лейкоцитов крови оценивали по индексу активности фагоцитоза (ФИ). Исследование общей гемолитической активности (CH50) определяли методом 50 % гемолиза. Активность кислородзависимых систем нейтрофилов оценивали по реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) общепринятыми методами [4]. Степень воспаления паренхимы печени оценивали по наличию воспалительных очагов путем подсчета количества инфильтратов на гистологических срезах (группы из 3 и более клеток в 10 случайных полях зрения при увеличении $\times 40$).

Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m). Существенность различий оценивали по U-критерию Манна — Уитни. Статистически значимыми считали различия с ($P < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. В результате проведенного исследования установлено, что длительное введение животным этанола на фоне ВЖР приводило к значительным изменениям иммунологических показателей и лабораторных параметров в периферической крови. Со стороны гематологических показателей наблюдалось повышение эозинофилов крови, что является характерным признаком воспалительного процесса. Кроме того, отмечались нарушения со стороны клеточного и гуморального иммунитета, доказательством чего являются достоверные изменения функционирования клеточных и гуморальных факторов иммунной системы у крыс, получавших алкоголь и ВЖР, по сравнению с группой контрольных животных. В отношении функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови

отмечено снижение их фагоцитарной способности (ФИ) на 13 % при значительной активации кислородзависимого метаболизма на 69 % (повышение сп. НСТ-теста) и снижении общей активности системы комплемента (табл.).

Таблица — Гематологические и иммунологические показатели крови крыс с АСГ, получавших берберин и его супрамолекулярный комплекс

Показатель	Контроль	АСГ	АСГ +берберин	АСГ +супрамолекулярный комплекс
с/я нейтрофилы,%	22,13 ± 3,0	19,67 ± 2,61	20,88 ± 2,11	20,86 ± 1,63
Эозинофилы,%	2,25 ± 0,56	3,67 ± 0,500	1,14 ± 0,46 ^b	1,63 ± 0,63 ^b
Моноциты,%	6,38 ± 0,84	5,67 ± 1,04	3,12 ± 0,58 ^a	5,75 ± 0,84
Лимфоциты,%	68,75 ± 3,48	69,13 ± 2,24	71,25 ± 2,5	69,00 ± 1,83
ФИ,%	83,13 ± 2,82	72,13 ± 2,3 ^a	89,00 ± 3,14 ^b	88,00 ± 1,51 ^b
СН50 у.е.	62,63 ± 1,87	59,38 ± 0,93 ^a	60,54 ± 2,09	64,02 ± 1,76 ^b
НСТ,%	13,33 ± 1,99	22,50 ± 2,44 ^a	6,88 ± 1,2 ^{ab}	9,86 ± 2,13 ^b

Примечание: здесь и далее ^a — статистически значимое отличие от контрольной группы животных; ^b — по сравнению с группой АСГ; ^c — по сравнению с группой АСГ + берберин.

При гистологическом исследовании печени крыс с АСГ на фоне стеатоза отмечалась выраженная очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация паренхимы печени, а также в области околососудистого русла. Очаги воспаления были в основном больших размеров, часто занимая 1/3 поля зрения. В половине случаев в одном поле зрения наблюдалось несколько очагов (3 и более, средних размеров). Анализ состояния паренхимы и сосудов показал, что в сосудистом русле были выраженные патологические изменения: гиперплазия сосудов.

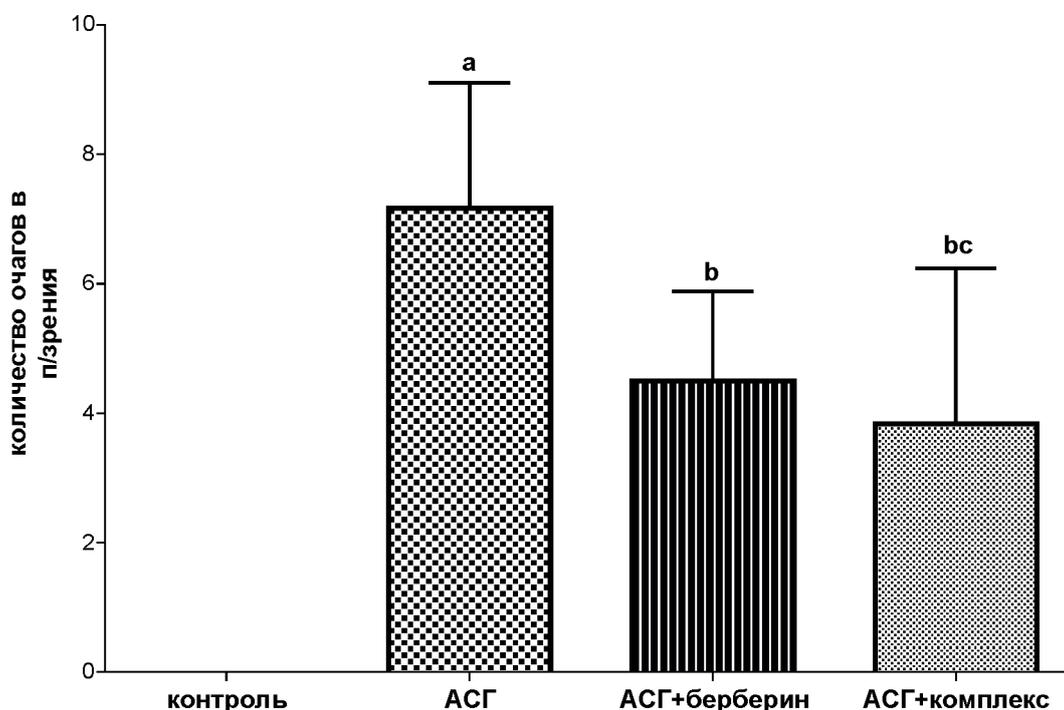


Рисунок — Количество воспалительных очагов (в п/зрения) в паренхиме печени крыс с АСГ, получавших берберин и его супрамолекулярный комплекс

Как видно из таблицы, введение берберина и его супрамолекулярного комплекса вызвало положительную динамику в функционировании иммунной системы: отмечалось уси-

ление процессов распознавания антигенов, о чем свидетельствует повышение фагоцитарной активности нейтрофилов на 23 % и 22 % соответственно. Метаболическая активность нейтрофилов достоверно снижалась в обеих группах. Следует отметить, что при введении супрамолекулярного комплекса берберина показатели метаболической активности нейтрофилов приближались к контрольным значениям, в то время как монопрепарат берберина снижал данный показатель ниже контрольных значений, что, вероятно, свидетельствует о снижении внутриклеточных бактерицидных процессов. Наряду с этим комплексная субстанция достоверно повышала общую активность системы комплемента. Оба препарата снижали уровень эозинофилов в периферической крови.

У животных, получавших берберин, наблюдалось статистически достоверное снижение очаговой инфильтрации. Очаги были в основном средних и малых размеров, однако встречались единичные больших размеров. Гиперплазия сосудов сохранялась.

Супрамолекулярный комплекс берберина приводил к более значительному снижению количества воспалительных очагов, чем монопрепарат. При этом преимущественно наблюдались очаги малых и средних размеров в сочетании с незначительной гиперплазией сосудов.

Заключение. Полученные нами результаты показали, что берберин и его супрамолекулярный комплекс с 2-HP-β-CD в условиях АСГ проявляли иммуностимулирующее/иммуномодулирующее действие, стимулируя фагоцитарные процессы. В отличие от берберина его комплексная форма нормализовала генерацию активных форм кислорода клетками и активировала общую активность системы комплемента, что, несомненно, способствует повышению общей неспецифической резистентности организма. Наряду с этим стоит отметить и противовоспалительные свойства берберина и его комплекса с 2-HP-β-CD, о чем свидетельствует снижение количества воспалительных очагов в паренхиме печени, причем действие комплексированной формы берберина было более выраженным.

Список литературы

1. Алкогольная болезнь печени: иммунологические механизмы патогенеза — новый взгляд на целесообразность применения Саденозил-L-метоинина / И.Г. Никитин [и др.] // Фарматека. — 2012. — № 13. — С. 51–55.
2. Маевская, М.В. Цитокины в патогенезе алкогольного гепатита и возможности терапии / М.В. Маевская, А.О. Буеверов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2009. — Т. 19, № 2. — С.14–19.
3. Нарушения в системе клеточного иммунитета у больных с алкогольной зависимостью и перспективы их коррекции с помощью иммуномодулятора тактивина / Н.Б. Гамалея [и др.] // Вопросы наркологии. — 2000. — № 3. — С. 54–60.
4. Новиков, Д.К. Клиническая иммунопатология : руководство. / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков. — М. : Мед. лит. — 2009. — С. 273–288.
5. Celli, R. Pathology of Alcoholic Liver Disease / R. Celli, X. J. Zhang // J. Clin. Transl. Hepatol. — 2014. — Vol. 2. — P. 103–109.
6. Imanshahidi, M. Berberis vulgaris and berberine: An update review / M. Imanshahidi, H. Hosseinzadeh // Phytother. Res. — 2016. — Vol. 30, № 11. — P. 1745–1764.
7. Neuman, M.G. Cytokines — central factors in alcoholic liver disease / M.G. Neuman // J. Alc. Res. Health. — 2003. — Vol. 27(4). — P. 307–316.
8. Pathogenesis of alcohol-induced liver disease: Classical concepts and recent advances / D. Seth [et al.] // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2011. — Vol. 26. — P. 1089–1105.

9. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability / C.S. Liu [et al.] // *Fitoterapia*. — 2016. — Vol. 109. — P. 274–282.

10. Vuddanda, P.R. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities / P.R. Vuddanda, S. Chakraborty, S. Singh // *Expert Opin. Investig. Drugs*. — 2010. — Vol. 19. — P. 1297–1307.

IMMUNOMODULATING EFFECT OF BERBERINE AND ITS SUPRAMOLECULAR COMPLEX IN ALCOHOL STEATHEPATITIS IN RATS

*Moroz V.L., Belonovskaya E.B., Naruta E.E., Eroshenko Yu.V.,
Kuzmitskaya I.A., Kirko S.N., Buko V.U.*

*Institute of Biochemistry of Biological Active Compounds,
NAS of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The immunomodulating effect of berberine and its supramolecular complex with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine were demonstrated in the model of alcoholic steatohepatitis in rats. It was shown that compared to the single drug administration, the introduction of a complex form of berberine to a greater extent restored the functional ability of cellular and humoral factors of the immune system, stimulating phagocytic processes, normalizing the generation of reactive oxygen species by cells and increasing the overall activity of the complement system.*

МАССА ТЕЛА САМЦОВ И САМОК КРЫС ПРИ УПОТРЕБЛЕНИИ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ И ДИАБЕТЕ II ТИПА: НАРУШЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ

Надольник Л.И., Полубок В.Ч., Лупачик С.В.

*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Длительное употребление высокожировой диеты (ВЖД) характеризуется нарушением регуляции массы тела, обусловленным дисбалансом механизмов обратной связи: более значительным у самцов, чем у самок крыс. В условиях сложных интегральных взаимодействий различных регуляторных молекул ключевая роль принадлежит глюкозе. ВЖД выявляет отрицательную, а развитие диабета II типа — положительную связь массы тела с уровнем глюкозы в интраперитонеальном глюкозотолерантном тесте при снижении взаимосвязей с адипокинами (адипонектин, лептин) и другими метаболитами.

Введение. Избыточное употребление высокожировой пищи рассматривается как один из факторов заболеваний, связанных с ожирением, нарушением углеводного обмена и развитием инсулинорезистентности. Установлено, что не только специфические нейрорегуляторы и гормоны, синтезируемые в гипофизе, адrenaловых железах, поджелудочной, щитовидной железе, а также половых железах, принимают участие в контроле массы тела [6, 10]. Выявлено большое количество гормоноподобных веществ, которые вырабатываются в различных тканях организма (мозг, мышца, жировая ткань, желудочно-кишечный тракт и др.) [8]. Достаточно хорошо изучена роль гормонов жировой ткани — адипокинов [3], интерлейкинов [11], а также факторов роста, нейрогомонов (агути-пептид, нейропептид Y (NPY), орексин А и В, производные проопиомеланокортина, эндоканнабиноиды) [2], гормонов пищеварительного тракта (грелин, пептид YY, глюкагоноподобный пептид-1) [5] и разобщающих белков [7]. Получены доказательства участия в регуляции массы тела большого количества молекул, роль которых и механизмы действия требуют дальнейшего изучения (хемерин, апелин, β -аррестин, висфатин, несфатин, ноцицептин и многие др.).

Одной из актуальных задач, связанных с проблемой контроля массы тела, является установление функциональных взаимосвязей между различными регуляторами и выявление тонких механизмов, нарушение которых приводит к разрушению стройной системы гомеостаза, связанного с поддержанием оптимальной массы тела в условиях «сурового» воздействия на организм образа жизни современного человека. При использовании большого количества регуляторных молекул организм выполняет огромную работу по поддержанию устойчивого, многоуровневого контроля аппетита и массы тела, что обусловлено отсутствием однозначных закономерностей в поступлении энергетических субстратов и программ их утилизации/накопления.

Цель работы — оценить влияние длительного употребления высокожировой диеты (ВЖД) на изменение массы тела у самцов и самок крыс, выявить характер взаимосвязи данного показателя со степенью нарушений углеводного обмена и показателями гормональной регуляции.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены в течение 21 недели на половозрелых самках и самцах крыс линии Вистар, массой соответственно 210–250 г (самки)

и 180–210 г (самцы). Крыс содержали в клетках по 5 особей, им обеспечивали в течение 24 часов неограниченный доступ к еде и воде. ВЖД имела калорийность 4,5 ккал/г (43 ккал % жиров, 37 ккал % углеводов, 20 ккал % белков) [9]. Контрольные животные содержались на стандартной диете вивария (2,2 ккал/г). Контроль массы тела и расчет еженедельного прироста массы тела животных проводился один раз в неделю на протяжении всего эксперимента. Модель выполнялась на шести группах животных: самки и самцы, соответственно — интактный контроль, ВЖД, ВЖД+стрептозотонин (СТЗ). Группе животных ВЖД+СТЗ после 12 недель (самки — 11 недель, самцы — 13 недель) употребления ВЖД внутривентриально проведены инъекции стрептозотонина (ChemCruz, U-9889) в дозе 40 мг/кг на фоне 12-часового голодания.

Интраперитонеальный глюкозотолерантный тест (ИГТТ) проводился дважды — через 12 недель употребления ВЖД и перед декапитацией. Толерантность к глюкозе оценивалась при введении крысам натошак раствора глюкозы (2 г/кг, интраперитонеально) с последующим измерением ее концентрации в крови из кончика хвоста — непосредственно перед введением (0 точка) и через 15, 30, 60, 90, 120 минут после введения [4]. Использовались разовые тесты (RightestTestStripsGS 100) и глюкометр Rightest GM100 («BionimeGmbH», Switzerland).

Определение концентрации гормонов в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа с применением коммерческих наборов (FineTest, Китай): адипонектина (ADP), кортикостерона (CORT), инсулина (INS), инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1), лептина (LEP), глюкагоноподобного пептида (GLP). Для оценки результатов анализа применялся мультимодальный планшетный ридер (Fluostar Omega, Германия). Определение концентрации триглицеролов, общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП в сыворотке крови проводили ферментативным методом, глюкозы — глюкозооксидазным методом (Анализ X, Республика Беларусь). Все спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре Cary 100 Scan Varian.

Межгрупповые сравнения проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу – Уоллесу в пакете статистических программ STATISTICA 12.0 (StatSoft, USA). Сравнение площадей под кривой (*area under curve*) глюкозотолерантного теста проводили с помощью критерия Манна – Уитни для повторяющихся измерений в программе MedCalc v.11.5.0.0. (MedCalcSoftware, Belgium). Полиномные линии тренда еженедельного прироста массы тела с шестью степенями сглаживания построены в программе Microsoft Office Excel 2010. Для выявления корреляционных связей между исследуемыми показателями использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (STATISTICA 12.0 (StatSoft, USA)).

Результаты исследования и их обсуждение. В условиях свободного доступа к ВЖД отмечается повышение массы тела самцов и самок крыс — наиболее значительно в первые три недели (рис. 1) — соответственно на 54,6 % и 11,4 %. Закономерности повышения массы у самцов и самок крыс на фоне ВЖД различались. Кривая массы тела самцов в течение первых 8 недель характеризуется параболической зависимостью (рис. 1а); у самок на протяжении всего эксперимента отмечается линейная зависимость (рис. 1б), что может быть связано некоторыми различиями в механизмах регуляции аппетита и массы тела, обусловленными полом животных [1]. За 18 недель употребления ВЖД масса самцов повысилась на 127,8 %, самок — на 37,4 %. После 5 недель эксперимента масса самцов контрольной группы повышалась более значительно, чем группы ВЖД (в отличие от самок). Через 2 недели после введения СТЗ масса животных группы (ВЖД+СТЗ) снижалась по сравнению с группой контроль — у самцов более выражено (15 нед, 13,4 %, $p = 0,04$) (рис. 1а).

Наиболее значимый еженедельный прирост массы тела отмечен в первую неделю употребления ВЖД, у самцов масса повысилась более чем на 50,0 г; каждую последующую неделю прирост был ниже, чем в предыдущую (см. рис. 2).

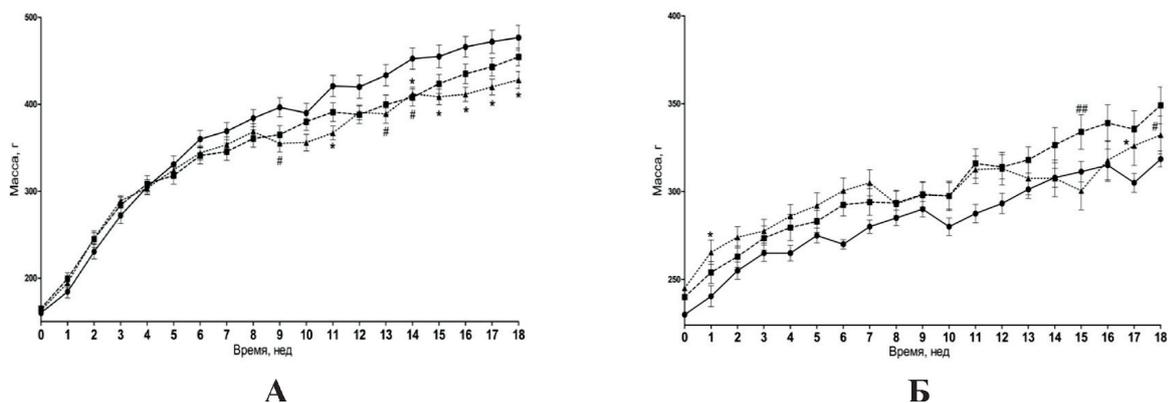


Рисунок 1 — Масса тела самцов (А) и самок (Б) крыс при употреблении ВЖД на протяжении 18 недель

Контрольная группа (—■—), группа ВЖД (—●—) и группа ВЖД+СТЗ (—▲—);

* — $p < 0,05$ и # — $0,05 < p < 0,1$ по сравнению с группой контроль;

— $0,05 < p < 0,1$ — по сравнению с группой ВЖД

К 6–8 неделе эксперимента прирост массы тела самцов стабилизировался (5–7 г) у групп ВЖД и контроль. В более поздние сроки изменение прироста массы тела характеризовалось волнообразной динамикой у самцов и самок; у самок «волна» проявлялась меньшей амплитудой в группе ВЖД и отрицательным балансом прироста массы в группе ВЖД+СТЗ после введения стрептозотоцина (13, 15, 17 недель). Наиболее значимый прирост массы у самок выявлен в группе ВЖД через 11 и 16 недель эксперимента (см. рис. 2б), а наименее значимый — через 8, 10 и 12 недель. У самцов крыс повышение данного показателя отмечалось через 10, 15 недель, а снижение — через 12 недель (рис. 2а).

Волнообразная динамика прироста массы тела (см. рис. 2а, б) отражает суммарные эффекты ключевых регуляторных молекул. В отсутствие других воздействий на экспериментальных животных, кроме ВЖД, это следствие изменения соотношения орексигенных/анорексигенных регуляторов, которое стабилизирует прирост массы тела к 6–8 неделе. В более поздние сроки отмечается выраженный дисбаланс в регуляции массы тела на фоне ВЖД, характеризующийся значительными подъемами (у самцов на 20–25 граммов) и падениями на протяжении 11–18-й недели. У самок крыс на 15–17-й неделе прирост массы в группе ВЖД превышал значения контрольных животных через 17 недель в 1,67 раза ($p = 0,03$).

Наиболее выразительно выявленные закономерности отражают полиномные линии тренда для еженедельного прироста массы тела крыс (рис. 2, в–е). Характер кривых свидетельствует, что контроль массы осуществляется по механизмам обратной связи, это наиболее выражено у контрольной группы самцов и самок. Низкая амплитуда колебаний массы предполагает, что у самок в отличие от самцов более тонкие механизмы регуляции массы тела (рис. 2, в–е). Период 8–9 недель, возможно, является критическим с точки зрения оптимальной адаптации к поступлению в организм ВЖД и регуляции массы тела на фоне употребления ВЖД, поскольку в дальнейшем характер полиномной кривой значительно изменяется. После 12 недель (рис. 2, д, е) отмечается повышение амплитуды кривой у самок группы ВЖД (рис. 2е, кривая 2), и в меньшей степени — у самцов (рис. 2д, кривая 2).

Из приведенных данных следует, что контроль аппетита не является совершенным для поддержания оптимальной массы тела и, соответственно, оптимальной активности метаболических процессов в организме. На фоне неограниченного употребления ВЖД (кривая 2, 3) в отличие от употребления диеты с нормальной калорийностью (кривая 1) могут отмечаться нарушения механизмов

контроля массы тела. Они проявляются значимыми изменениями характеристик волнообразной полиномиальной кривой: обнаружено увеличение ширины волны в 2–2,5 раза (рис. 2, д, е), что может свидетельствовать о нарушении контроля в поддержании оптимального соотношения орексигенных/анорексигенных регуляторов. По-видимому, это следствие развития резистентности к их действию (лептинорезистентность, инсулинорезистентность и др. виды резистентности).

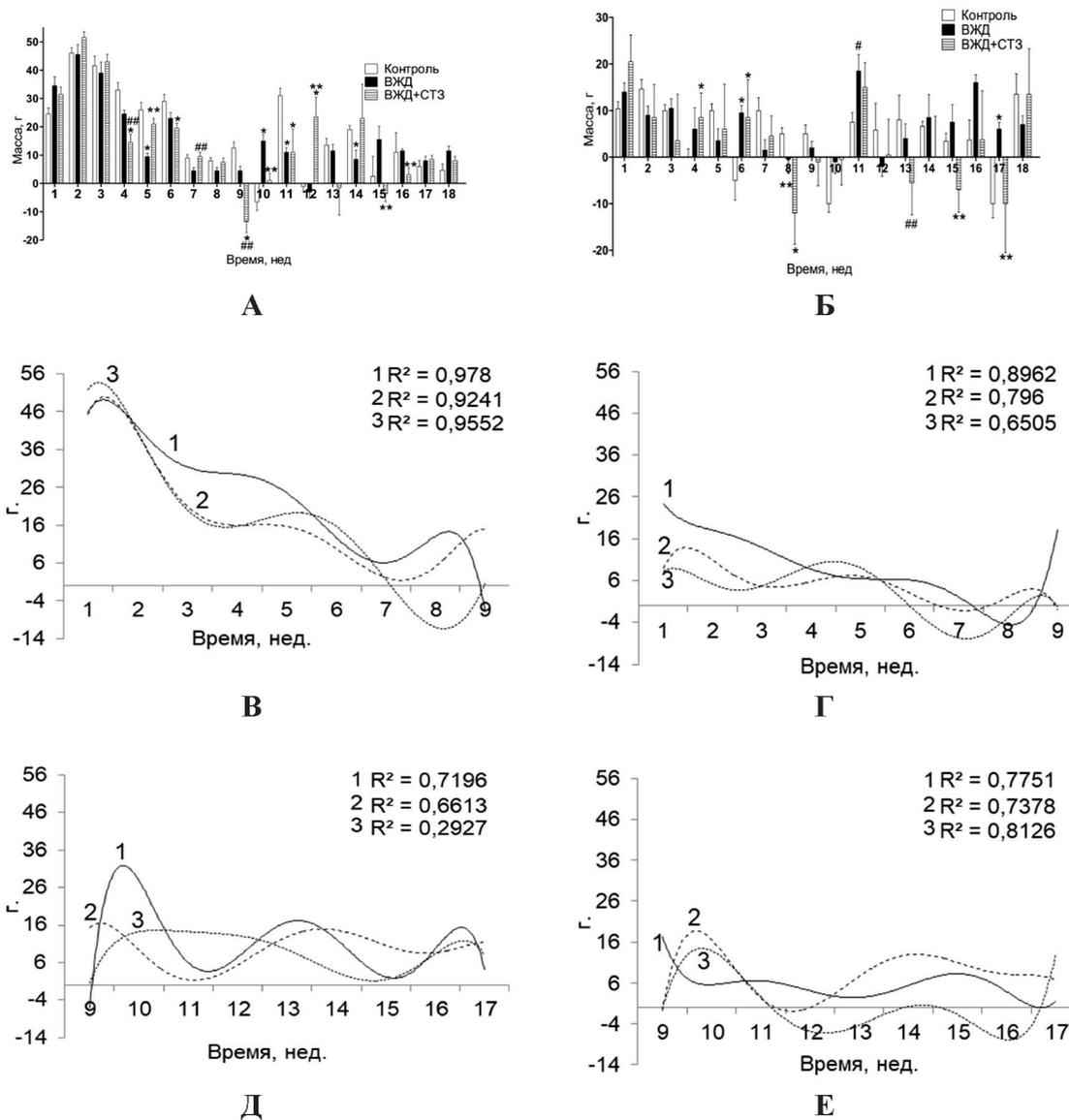


Рисунок 2 — Ежедневный прирост массы тела (г) самцов (А) и самок (Б) крыс на протяжении 18 недель употребления ВЖД и полиномиальные линии тренда еженедельного прироста массы тела в начале эксперимента (1–9 недель) и при его продолжении (9–18 недель) у самцов (В, Д) и самок (Г, Е) крыс

Контрольная группа (1) (—), группа (2) ВЖД (---), группа (3) ВЖД+СТЗ (.....)

* — $p < 0,05$ и # — $0,05 < p < 0,1$ — по сравнению с группой контроль;

** — $p < 0,05$ и ## — $0,05 < p < 0,1$ — по сравнению с группой ВЖД;

R^2 — величина достоверности аппроксимации

Проведенный корреляционный анализ показал наличие тесной связи массы тела (в начале эксперимента) у самцов крыс в группе ВЖД с уровнем глюкозы в ИГТТ через 15 минут ($r = -0,670732$, $p = 0,033763$), которая сохранялась через 12 ($r = -0,789634$, $p = 0,006589$) и 18 недель ($r = -0,685018$, $p = 0,028827$) употребления ВЖД. У самок крыс начальная масса отрицательно коррелировала с кон-

центрацией холестерина ($r = -0,634158$, $p = 0,048935$) в крови, и эта зависимость сохранялась и через 11 недель употребления ВЖД ($r = -0,685303$, $p = 0,028734$). Масса самок крыс после 11 недель употребления ВЖД коррелировала с уровнем глюкозы в ИГТТ, через 120 минут после ее введения ($r = -0,722773$, $p = 0,018199$), а также с уровнем триглицеролов в крови ($r = 0,595137$, $p = 0,069515$). На фоне ВЖД у самцов основным показателем, связанным с массой тела, является уровень глюкозы на 15 минуте в ИГТТ, что предполагает связь с регуляцией ее всасывания. У самок крыс высокий уровень триглицеролов в крови на фоне ВЖД может являться причиной повышения массы тела.

В контрольной группе самцов масса тела коррелировала с уровнем триглицеролов ($r = 0,88238$, $p = 0,001635$), лептина ($r = 0,68620$, $p = 0,041242$), активностью АСТ в крови ($r = -0,74478$, $p = 0,021320$), а также концентрацией глюкозы в ИГТТ через 120 минут ($r = -0,71008$, $p = 0,032085$). У самок выявлена связь с уровнем IGF ($r = 0,675160$, $p = 0,045988$), ADP ($r = -0,747042$, $p = 0,033177$), концентрацией глюкозы в ИГТТ только на 30 минут ($r = -0,600691$, $p = 0,066292$) и активностью ЩФ ($r = 0,603670$, $p = 0,064605$). У самок контрольной группы ключевую роль в регуляции массы тела играет адипонектин, как и уровень глюкозы в ИГТТ; повышение их концентрации вызывает снижение массы, но увеличение IGF и ЩФ в крови связано с повышением массы. У самцов рост массы тела обусловлен ростом уровня лептина и триглицеролов, а снижение — активностью АСТ, уровнем глюкозы.

При развитии диабета выявлены корреляционные связи массы тела самцов крыс с уровнем IGF ($r = -0,87958$, $p = 0,003981$), глюкозы ИГТТ 15 ($r = 0,87395$, $p = 0,000946$), 30 ($r = 0,70778$, $p = 0,022021$), 60 ($r = 0,59699$, $p = 0,068427$), 90 ($r = 0,63392$, $p = 0,049046$), 120 минут ($r = 0,67085$, $p = 0,033720$), HbA1 ($r = 0,64008$, $p = 0,046221$), ТБКРС в больших полушариях мозга ($r = 0,89857$, $p = 0,000409$); у самок — с уровнем глюкозы в ИГТТ через 15 ($r = 0,801205$, $p = 0,016829$) и 60 минут ($r = 0,658733$, $p = 0,075667$) и ЛПВП в крови ($r = -0,683130$, $p = 0,061835$).

У группы ВЖД+СТЗ ключевую роль в регуляции массы играет уровень глюкозы у самцов и самок, повышение которого в крови является определяющим фактором увеличения массы тела, и это наиболее достоверно проявляется в ИГТТ. Изменение концентрации глюкозы в ИГТТ наиболее информативно отражает нарушения метаболизма глюкозы, связанные с изменением ее всасывания, утилизации, развитием инсулинорезистентности. В группе ВЖД и ВЖД+СТЗ — в отличие от контроля отсутствуют корреляционные связи с уровнем адипонектина и лептина; если в группе ВЖД масса отрицательно коррелирует с уровнем глюкозы, то в группе ВЖД+СТЗ выявлена положительная взаимосвязь этих показателей (вне зависимости от пола животных), но у самцов она более значима. У самцов крыс при диабете появляется связь массы с уровнем ТБКРС в мозге, что косвенно может свидетельствовать о вкладе метаболических нарушений на уровне ЦНС [1].

Заключение. Из приведенных данных следует, что контроль аппетита не является совершенным для поддержания оптимальной массы тела и, соответственно, оптимальной активности метаболических процессов в организме. Длительное употребление ВЖД вызывает повышение массы тела, а также нарушение функции ключевых регуляторных молекул (лептина, адипонектина, IGF и др.), о чем свидетельствует отсутствие корреляционных связей данных показателей с массой тела у животных группы ВЖД+СТЗ. Выявлена тесная взаимосвязь массы тела самцов группы ВЖД с уровнем глюкозы в ИГТТ (15 минут), которая усиливается при развитии диабета II типа (15, 30, 60, 90, 120 минут). Характер полиномиальных линий тренда еженедельного роста массы крыс предполагает нарушение интегральных механизмов обратной связи, связанных с контролем массы тела. Важнейшим условием контроля метаболических процессов в организме является контроль баланса энергетических запасов, который, вероятно, организм не в состоянии регулировать должным образом на фоне употребления ВЖД. Полагаем, что это может объяснить отсутствие в настоящее

время эффективных способов контроля массы тела, несмотря на наше глубокое понимание молекулярных механизмов развития ожирения [2].

Список литературы

1. Линейные и гендерные различия в биохимических показателях и показателях обеспеченности жирорастворимыми витаминами у крыс на *in vivo* модели метаболического синдрома / С.А. Апрятин [и др.] // Вопросы питания. — 2018. — Т. 87, № 1. — С. 51–62.
2. Нейромедиаторы и нейропептиды — биомаркеры метаболических нарушений при ожирении / И. В. Гмошинский [и др.] // Проблемы эндокринологии. — 2018. — Т. 64, № 4. — С. 258–269.
3. Adipokines and insulin resistance / K. Rabe [et al.] // Mol. Med. — 2008. — Vol. 14, № 11–12. — P. 741–751.
4. Diet-induced obesity in Sprague-Dawley rats causes microvascular and neural dysfunction / E.P. Davidson [et al.] // Diabetes/Metabolism Research and Reviews. — 2010. — Vol. 26, № 4. — P. 306–318.
5. Geloneze, B. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists (GLP-1ras) in the brain-adipocyte axis / B. Geloneze, J.C. De Lima-Junior, L.A. Velloso // Drugs. — 2017. — Vol. 77, № 5. — P. 493–503.
6. Iwen, K.A. Thyroid Hormones and the Metabolic Syndrome / K.A. Iwen, E. Schröder, G. Brabant // J. Eur. Thyroid. — 2013. — № 2. — P. 83–92.
7. Kajimura, S. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis / S. Kajimura, M. Saito // Annual review of physiology. — 2014. — Vol. 76. — P. 225–249.
8. Kershaw, E.E. Adipose tissue as an endocrine organ / E.E. Kershaw, J. S. Flier // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2004. — Vol. 89, № 6. — P. 2548–2556.
9. Skovsø, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. / S. Skovsø // Journal of Diabetes Investigation. — 2014. — Vol. 5, № 4. — P. 349–358.
10. Suzuki, K. Obesity and appetite control / K. Suzuki, C.N. Jayasena, S.R. Bloom // Exp Diabetes Res. 2012. — Article ID 824305. — 19 p.
11. The roles of IL-6, IL-10 and IL-1RA in obesity and insulin resistance in African-Americans / B. A. Charles [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2011. — Vol. 96, № 12. — P. E2018–E2022.

BODY MASS OF MALE AND FEMALE RATS IN CONSUMPTION OF HIGH FAT DIET IN TYPE II DIABETES: DISTURBANCES IN REGULATORY MECHANISMS

Nadolnik L.I., Polubok V.Ch., Lupachik S.V.

*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the NAS of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. Long-term consumption of a high fat diet (HFD) was characterized by disturbed regulation of body mass in rats (more pronounced in males compared to females) due to the imbalance in feedback mechanisms. Under conditions of complex integral interactions between different regulatory molecules a key role belonged to glucose. The HFD revealed a negative relationship, whereas the development of type II diabetes showed a positive one between the body mass and the glucose level in the intraperitoneal glucose-tolerant test under decreased relationships with adipokines (adiponectin, leptin) and other metabolites.

РАЗРАБОТКА ИНФУЗИОННЫХ РАСТВОРОВ НА ОСНОВЕ ВЫСОКООЧИЩЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ С ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ СОСТАВОМ

Нефёдов Л.И., Глазев А.А.

*Учреждение образования
«Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Мини-обзор современных литературных и собственных данных о результатах и перспективах применения L-аминокислот в качестве универсальных природных регуляторов обмена веществ и новых лекарственных препаратов.

В современных условиях в комплексе лечения больных одно из ведущих мест занимает инфузионно-трансфузионная терапия, в основе которой лежит применение различных кровезаменителей. В них нуждается около 30–40 % больных хирургического профиля и до 80 % пострадавших при авариях и катастрофах [1].

Вместе с тем на основании доступных литературных данных до настоящего момента не разработано эффективных трансфузионных сред, способных длительно циркулировать в крови, улучшать гемодинамику, микроциркуляцию и одновременно обладать направленным метаболическим (регуляторным) действием на ключевые обменные реакции и функции. Так, использование для инфузионной терапии практикуемых монокомпонентных плазмозаменителей способствует реализации одной или нескольких задач, оставляя другие, не менее важные, на втором плане. Это усложняет своевременное, максимально адекватное лечение [2, 7, 9].

В последнее время в экспериментальной трансфузиологии все большее предпочтение отдается разработке и применению многокомпонентных кровезамещающих растворов полифункционального действия [3], что подтверждает необходимость разработки препаратов данной группы в Республике Беларусь для обеспечения ее экономической независимости и безопасности.

Фармацевтические отрасли промышленности большинства высокоразвитых стран, в том числе Республики Беларусь, в настоящее время активно используют высокоочищенные субстанции аминокислот в качестве полноценных пищевых добавок и субстанций для производства энтеральных лекарственных препаратов [4].

Особенно значимым направлением является широкое использование кристаллических аминокислот в производстве жизненно важных их искусственных смесей для парентерального питания в качестве кровезамещающих растворов, абсолютно необходимых в реанимационной и хирургической практике. Такие препараты, как «Полиамин» (Россия), «Аминостерил КЕ 10 %» (ФРГ), «Вамин» (Швеция), «Фриамин (США) и многие другие применяются в первую очередь с заместительной целью, прежде всего на основе суточной потребности в белке для поддержания положительного азотистого баланса.

В последующем для реализации патогенетически обоснованного действия отдельных аминокислот, на основе органной специфики и особенностей их межорганного метаболизма были

разработаны специализированные рецептуры, сочетающие условия парентерального питания и патогенетической коррекции патологии печени (гепа-), почек (нефро-) или применения в педиатрической практике (пед-). Такие растворы аминокислот содержат значительно больше (разветвленные) или меньше (ароматические, метионин) или включают практически только незаменимые аминокислоты (нефро-) [4, 5, 6, 8].

При оценке эффективности этой группы аминокислотных растворов пользуются результатами клинических лабораторных исследований и критериями специфической фармакологической активности, включая данные аминокрамм.

Перечисленные свойства указанных аминокислот для парентерального питания на практике определяют необходимость их комбинированного (сочетанного или последовательного) применения с препаратами других групп, что усложняет выполнение терапевтических мероприятий и способно вызвать аминокислотный дисбаланс [3, 9]. Одновременно многочисленными исследованиями доказано, что устранение или коррекция изменений промежуточного обмена веществ при инфузионной терапии [8] может быть достигнуто путем применения универсальных природных биорегуляторов — соединений, влияющих непосредственно на механизмы клеточного метаболизма в эндогенных концентрациях [3].

Перечисленное основано на многочисленных доказательствах, что аминокислоты являются не только строительными блоками для биосинтеза белков, но и предшественниками регуляторов, сигнальными молекулами и модификаторами биологических реакций, а также соединениями, играющими ключевую роль в интеграции основных метаболических потоков [4, 6, 8].

Свободные аминокислоты представлены широким спектром родственных по химической структуре соединений, формирующих в физиологических жидкостях аминокислотный пул. Количественное определение пула свободных аминокислот в физиологических жидкостях способствует ранней диагностике различных заболеваний, включая диабет, рак, патологию сердечно-сосудистой системы, почек и печени [6].

Для этого методами многомерного математического анализа рассчитываются индексы аминокислотных профилей, позволяющих определить биомаркеры заболевания или отклонения от нормы [5].

Предлагаемая для обсуждения методология наших разработок состоит:

– исследовании в плазме крови эндогенных концентраций свободных аминокислот, их производных, предшественников и метаболитов и маркерных биохимических параметров у практически здоровых доноров;

– исследовании в плазме крови эндогенных концентраций свободных аминокислот, их производных, предшественников и метаболитов и маркерных биохимических параметров и при различной патологии;

– создании единой базы данных по исследуемым показателям, построение эмпирической математической модели, включающей патогенетические маркеры определенной патологии и аминокислотные профили плазмы крови;

– разработке рецептур специализированных композиций инфузионных гемокорректоров на основе аминокислот.

Коллективом НИЛ биохимии биологически активных веществ ГрГУ им. Я. Купалы разработана собственная концепция применения закономерностей формирования фонда свободных аминокислот и их производных в биологических жидкостях и тканях человека при различных патологических состояниях [3, 4] для разработки рецептур новых многокомпонентных крове-

замещающих растворов на основе аминокислот и родственных соединений, предназначенных для коррекции метаболического дисбаланса, возникающего при различных заболеваниях.

Реализация данной концепции возможна благодаря природной полифункциональности свободных аминокислот и широкому спектру их биологических, в первую очередь специфических регуляторных эффектов на функциональное состояние органов и систем, поскольку соединения этого класса являются ключевыми и связующими метаболитами.

Состав и количество высокоочищенных аминокислот в предлагаемых инфузионных кровезамещающих растворах определяется их эндогенными (регуляторными) концентрациями, что выгодно отличает их от традиционно применяемых импортных растворов аминокислот для парентерального питания, где содержание их компонентов рассчитывается исходя из суточной потребности в них организма человека без учета регуляторного действия вводимых соединений.

Предлагаемые для разработки многокомпонентные кровезамещающие растворы на основе аминокислот и их метаболитов благодаря высокой степени полифункциональности, биосовместимости, отсутствию антигенных свойств и стабильной гемодинамической эффективности, должны обладать комплексным действием в направлении «метаболического комфорта» и сочетая в себе не только различные функции кровезаменителей, быть абсолютно безопасными, не вызывающими развитие аллергических реакций, предупреждающими развитие осложнений, вызванных повреждениями различного генеза.

Накопленный опыт клинического использования отечественных препаратов отдельных высокоочищенных аминокислот («Лейцин», «Тавамин», «Глицин», «Триптофан») свидетельствует о перспективах применения многокомпонентных растворов аминокислот с концентрацией каждого соединения, рассчитанной в соответствии с его метаболическим профилем в крови человека при определенной патологии, как компонента инфузионной терапии при экстремальных состояниях на догоспитальном и госпитальном этапах лечения больных.

Таким образом, разработка и создание в Республике Беларусь новых многокомпонентных отечественных аминокислотных смесей в соответствии с патогенетически детерминированными изменениями их эндогенных концентраций для ликвидации аминокислотного дисбаланса и метаболической терапии по конкретным показаниям является одним из элементов обеспечения экономической независимости и безопасности страны.

Список литературы

1. Анализ рынка ряда групп инфузионных растворов в РФ. Аналитический отчет. — СПб.: Цитомед маркетинг, 2001. — 135 с.
2. Габитова, Н. Применение плазмозаменителей комплексного действия — современное направление инфузионной терапии / Н. Габитова, Л. Алексеева // Врач. — 2002. — № 11. — С. 45–67.
3. Нефёдов, Л.И. Формирование фонда свободных аминокислот и их производных в условиях метаболического дисбаланса: автореф. ... дис. докт. мед. наук: 03.00.04 / Л.И. Нефёдов; ИРБ НАНБ. — Минск, 1993. — 34 с.
4. Нефёдов, Л.И. Биохимические основы метаболической терапии / Л.И. Нефёдов // Биохимические аспекты жизнедеятельности биологических систем: сб. науч. тр. / ГрГУ; под ред. Л.И. Нефёдова. — Гродно, 2000. — С. 212–219.
5. Amino Acids as Regulators and Components of Nonproteinogenic Pathways / A. Meijer // J. Nutrition, 2000. — Vol. 36. — P. 243–257.
6. Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms / A. Bruhat [et al.] // Biofactors. — 2009. — Vol. 35. — P. 249–257.

7. European Pharmacopoeia / Fifth edition. — Strasbourg: Council of Europe, 2004. — 2779 p.
8. State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples / D. Fekkes // J. Chromatogr. B. Biomed. Appl. — 1996. — Vol. 682. — P. 3–22.
9. USP 28. The United States Pharmacopoeia. NF 23 The National Formulary. — Rockville: United States Pharmacopoeial convention, Inc., 2005. — 3187 p.

THE DEVELOPMENT OF INFUSION SOLUTIONS BASED ON HIGH PURITY AMINO ACIDS WITH PATHOGENETICALLY DETERMINED PROPERTIES

Nefyodov L.I., Glazev A.A.

*Yanka Kupala State University of Grodno,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *Minireview is given in this article on results and prospects of using amino acids as universal natural regulators of metabolism and novel medicinal preparations.*

ИЗМЕНЕНИЯ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МИКРОБНО-ТКАНЕВОМ КОМПЛЕКСЕ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА И ПЕЧЕНИ В ДИНАМИКЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Николаева И.В., Смирнов В.Ю., Шейбак В.М.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Исследовано влияние внутрижелудочного введения этанола на пул свободных аминокислот микробно-тканевого комплекса тонкого кишечника и печени крыс. При введении этанола в наркотической дозе (4,5 г/кг) повышается содержание глутамата, аспарагина, аланина в энтероцитах и глутамина в печени, что указывает на увеличение их использования в качестве энергетических субстратов, а относительное повышение общего количества незаменимых аминокислот, в том числе АРУЦ, может свидетельствовать о торможении процессов синтеза белка.

Введение. В настоящее время признано, что существует тесное взаимодействие между кишечником и печенью, именуемое «осью кишечник–печень» [2]. Печень и в меньшей степени желудочно-кишечный тракт являются основными органами, участвующими в метаболизме этанола, а следовательно, подвергаются наибольшему повреждению при его злоупотреблении [2, 7]. Этанол вызывает дисбиоз — изменения со стороны слизистой оболочки и повышение проницаемости кишечного барьера для микробных токсинов, что приводит к эндотоксемии [3]. Кроме того, микробные метаболиты, такие как короткоцепочечные жирные кислоты (бутират, ацетат и пропионат), уровень которых изменяется после употребления этанола, могут влиять на белки межклеточных соединений и иммунную толерантность [9]. Влияние этанола на абсорбцию нутриентов, состояние клеток слизистой кишечника и собственно кишечного барьера будет определять степень воздействия на клетки печени метаболитов и токсинов, а значит, и состояние метаболизма аминокислот и белков в этом органе [1, 3, 7].

Целью исследования являлось изучение формирования пула свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и печени крыс при периодической острой алкогольной интоксикации.

Материалы и методы исследования. Для эксперимента были использованы белые крысы, массой 140–160 г, которые находились на стандартном рационе вивария со свободным доступом к питьевой воде. При моделировании острой алкогольной интоксикации животным первой экспериментальной группы (контроль) внутрижелудочно вводили 1 мл физиологического раствора NaCl, второй — 25 % раствор этанола в дозе 4,5 г/кг массы однократно, третьей — раствор этанола в аналогичной дозе, с интервалом 24 ч в течение трех дней. Через 24 ч после последнего введения этанола животных декапитировали. Эксперименты выполнялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Определение свободных аминокислот проводили в хлорнокислых безбелковых экстрактах печени имикробно-тканевого комплекса тонкого кишечника методом ВЭЖХ с помощью хроматографической системы *Agilent 1100*. Анализ данных выполнен с использованием пакета программ *Statistica 6.0*. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции (r) Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение. Через сутки после однократного введения этанола в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника не обнаружили значимых количественных изменений аминокислотного фонда (рис. 1). Ниже контрольных значений был лишь индекс заменимые/незаменимые аминокислоты, свидетельствующий о преимущественном вкладе незаменимых аминокислот в обогащении аминокислотного пула энтероцитов тонкого кишечника.

В печени через 24 ч после поступления этанола увеличивалось суммарное количество азотсодержащих производных и метаболитов аминокислот (на 20 %, $p = 0,02$), что привело к снижению индекса протеиногенные аминокислоты/производные аминокислот (на 34 %, $p = 0,02$). Несмотря на отсутствие колебаний индивидуальных концентраций незаменимых аминокислот, наблюдается тенденция к повышению их общего количества (1908 нмоль/г против 1533 нмоль/г соответственно), что отразилось на уменьшении индекса заменимые/незаменимые аминокислоты (на 19 %, $p = 0,05$) (см. рис. 1). Влияние острой алкогольной интоксикации и трехкратного введения этанола на индивидуальные показатели аминокислотного пула в микробно-тканевом комплексе представлены на рис. 2.

Анализ концентраций свободных аминокислот и метаболитов в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника (см. рис. 2) выявил увеличение содержания незаменимой аминокислоты треонин (на 41 %, $p = 0,007$) при одновременном снижении уровней глицина (на 38 %, $p = 0,004$) и аланина (на 10 %, $p = 0,02$), что отразилось на уменьшении индекса заменимые/незаменимые аминокислоты (на 15 %, $p = 0,03$).

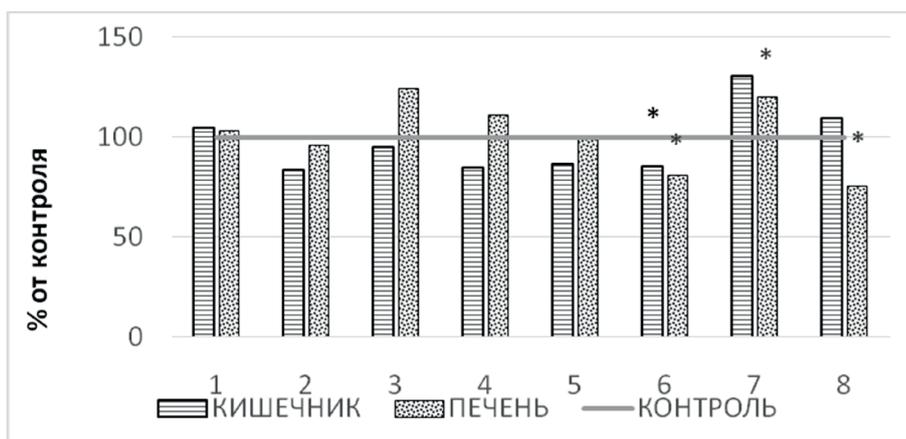


Рисунок 1 — Формирование аминокислотного фонда микробно-тканевого комплекса тонкого кишечника и печени после разового введения этанола относительно контрольных значений (контроль — 100 %):

- 1 — общее количество аминокислот и их производных;
 2 — общее количество заменимых аминокислот; 3 — общее количество незаменимых аминокислот;
 4 — общее количество АРУЦ; 5 — общее количество протеиногенных аминокислот;
 6 — заменимые/незаменимые аминокислоты; 7 — общее количество производных аминокислот;
 8 — протеиногенные аминокислоты/азотсодержащие метаболиты.
 Здесь и на рис. 2–4 * отмечены статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

Треонин-незаменимая гидроксиаминокислота, которая активно включается в состав белков слизистой оболочки кишечника [9]. Можно предположить, что внутрижелудочное поступление этанола влияет на абсорбтивную функцию энтероцитов, снижая использование треонина для образования белкового компонента муцина кишечника. [1, 3, 8]. Ниже контрольных значе-

ний были концентрации азотсодержащего производного — фосфоэтаноламина (на 30 %, $p = 0,02$), что свидетельствует об изменении интенсивности синтеза фосфолипидов в энтероцитах, влекущее за собой мембранные эффекты [10]. Обнаружено значительное снижение концентрации цистатионина (на 34 %, $p = 0,002$) привело к повышению метаболического индекса серин/цистатионин (13,5 против 7,6 в контроле), который отражает нарушения метаболизма аминокислот, предшественников метионина и цистеина по пути транссульфирования [6].

Падение уровня орнитина (на 45 %, $p = 0,001$) возможно свидетельствует о повышенной его утилизации для детоксикации аммиака в цикле образования мочевины или переключение метаболизма аммиака на синтез глутамина с помощью фермента глутаминсинтетазы [1]. Одновременно был повышен уровень α -аминомасляной кислоты (на 95 %, $p = 0,02$), которая является продуктом окислительной деградации аминокислот [5, 9].

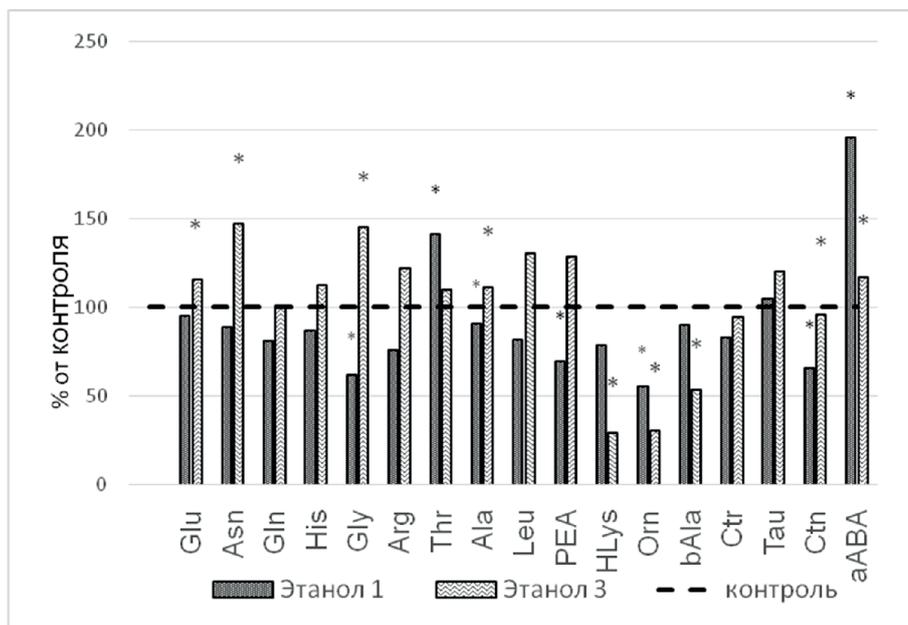


Рисунок 2 — Изменение содержания свободных аминокислот и их производных в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника крыс, получавших этанол однократно и в течение трех дней, относительно контрольных значений (контроль 100 %)

Трехкратное ежедневное введение этанола поддерживало и усугубляло развивающийся аминокислотный дисбаланс в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника, который на фоне увеличения пула свободных аминокислот и их производных (на 20 %, $p = 0,009$), характеризовался повышением общего содержания протеиногенных аминокислот (на 22 %, $p = 0,03$) (рис. 3), индивидуальных концентраций заменимых аминокислот: аспарагина (на 47 %, $p = 0,02$), глутамата (на 15 %, $p = 0,05$), глицина (на 45 % ($p = 0,02$), аланина (на 11 %, $p = 0,03$)(см. рис. 2). Глутаминовая кислота участвует, с одной стороны, в процессах переаминирования аланина и аспартата, а с другой — в межорганном транспорте аминокислот и одновременно является предшественником основного клеточного антиоксиданта — глутатиона. Можно предполагать, что одновременное увеличение концентрации свободного глицина указывает на снижение синтеза этого трипептида и сдвиг окислительно-восстановительного баланса.

В энергетическом гомеостазе организма важная роль принадлежит аланину. Основным донатором аминокислот для аланина служат АРУЦ. В цикле Кори в печени при участии глутамата и аланинаминотрансферазы генерируется пируват [4].

Несмотря на то, что индивидуальные концентрации незаменимых аминокислот достоверно не изменялись, выявлено повышение суммарного количества незаменимых аминокислот (на 29 %, $p = 0,05$), среди которых доминирует повышение общего количества АРУЦ (на 28 %, $p = 0,04$) (см. рис. 3). АРУЦ являются лимитирующими субстратами при биосинтезе белка. Повышение их концентраций в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника может указывать либо на торможение биосинтеза белка в клетках кишечника, либо на повышенную его деградацию.

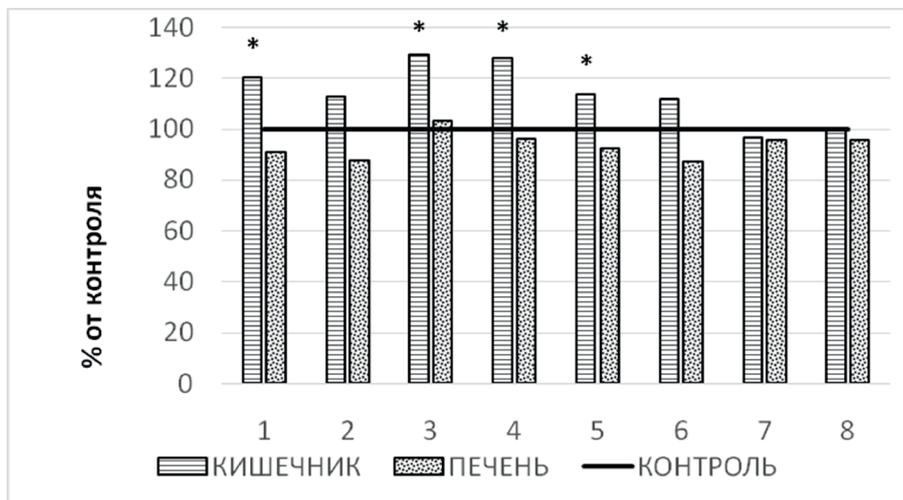


Рисунок 3 — Формирование аминокислотного фонда микробно-тканевого комплекса тонкого кишечника и печени после трехдневного введения этанола относительно контрольных значений (контроль 100 %):

1 — общее количество аминокислот и их производных; 2 — общее количество заменимых аминокислот; 3 — общее количество незаменимых аминокислот; 4 — общее количество АРУЦ; 5 — общее количество протеиногенных аминокислот; 6 — индекс заменимые/незаменимые аминокислоты; 7 — общее количество производных аминокислот; 8 — индекс протеиногенные/азотсодержащие метаболиты

Суммарное содержание азотсодержащих производных аминокислот оставалось в пределах контрольных значений, хотя определенный дисбаланс среди отдельных метаболитов имел место и характеризовался снижением концентраций β -аланина (в 1,9 раза, $p = 0,003$), гидроксизина (в 3,5 раза, $p = 0,003$), орнитина (в 3,3 раза, $p = 0,002$), повышением соотношений аргинин/орнитин (в 4 раза, $p = 0,0008$) и аргинин/цитруллин (в 1,8 раза) (см. рис. 2). Еще одним механизмом снижения уровня орнитина в динамике алкогольной интоксикации, возможно, является его усиленный метаболизм в полиамины с целью обеспечения адекватной скорости клеточной пролиферации. Поскольку количество азотсодержащих метаболитов аминокислот существенно не изменяется, это свидетельствует не в пользу усиления катаболизма, то можно предположить торможение процессов биосинтеза белка в энтероцитах тонкого кишечника.

Влияние трехкратной алкогольной интоксикации на формирование аминокислотного пула печени схематически представлено на рис. 3. Выявлены в равной степени сниженные концентрации заменимых аминокислот: глутамата и аланина (на 27 %, $p = 0,002$), аргинина (на 29 %, $p = 0,005$), гистидина (на 42 %, $p = 0,002$), фосфоэтаноламина (на 61 %, $p = 0,04$), (см. рис. 4). По данным литературы, уменьшение клеточного пула *L*-аргинина может обуславливаться нарушением поступления его в клетку или интенсивным использованием в метаболических процессах. Основным поставщиком эндогенного аргинина является катаболизм белка в клетках [1].

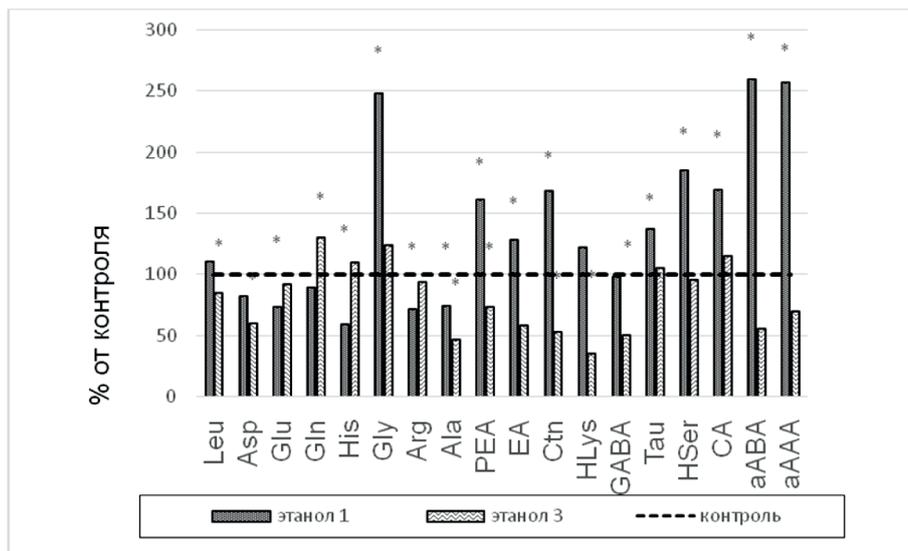


Рисунок 4 — Изменение содержания свободных аминокислот и их производных в печени крыс, получавших этанол однократно и в течение трех дней относительно контрольных значений (контроль 100 %)

Одновременно регистрировались (рис. 4) увеличения уровней глицина (в 2,5 раза, $p = 0,001$), а также производных: таурина (на 36 %, $p = 0,01$), гомосерина (на 85 %, $p = 0,03$), цистатионина (на 67 %, $p = 0,02$), этаноламина (на 28 %, $p = 0,002$), цистеиновой кислоты (на 68 %, $p = 0,01$), α -аминомасляной и α -аминоадипиновой кислот (в 2,6 раза, $p = 0,0005$ и $0,0001$ соответственно).

Ежедневное энтеральное введение этанола в течение трех дней существенно не влияло на суммарное содержание протеиногенных аминокислот и азотсодержащих производных в печени крыс (см. рис. 3). Однако анализ индивидуальных концентраций показал уменьшение количества незаменимой аминокислоты лейцина (на 16 %, $p = 0,03$), а также аспарагина (на 40 %, $p = 0,005$) и производных: фосфоэтанолamina (на 27 %, $p = 0,04$), гидроксизина (на 66 %, $p = 0,01$), цистатионина (на 48 %, $p = 0,02$) и конечного продукта деградации аминокислот — γ -аминомасляной кислоты (на 50 %, $p = 0,01$), на фоне повышенного уровня глутамина (на 30 %, $p = 0,01$) (см. рис. 4).

Заключение. На основании изложенного выше можно сделать следующие выводы:

1. Внутривентрикулярное однократное введение этанола в дозе 4,5 г/кг массы в виде 25 % раствора вызывает увеличение в микробно-тканевом комплексе кишечника концентрации треонина, ключевой аминокислоты для синтеза муцинов и формирования гликокаликса. Одновременно регистрируется снижение соединений, необходимых для пролиферации клеток и осуществления межклеточных коммуникаций (глицин, цистатионин, орнитин, аланин и фосфоэтаноламин). Следует отметить компенсаторную наработку глицина в ситуации более длительного поступления алкоголя в организм животных.

2. В печени однократное поступление этанола вызывает дисбаланс аминокислотного пула, который характеризуется увеличением суммарного количества азотсодержащих производных и метаболитов аминокислот.

3. Через сутки после острой алкогольной интоксикации концентрации отдельных протеиногенных аминокислот снижаются на фоне повышенной концентрации глицина.

4. Трехкратное введение этанола приводило к повышению содержания глутамата, аспарагина, глутамата, аланина в энтероцитах глутамина в печени, что указывает на возможное их

использования в качестве энергетических субстратов, а относительное увеличение общего количества незаменимых аминокислот, в том числе АРУЦ, может свидетельствовать о торможении процессов синтеза белка.

5. Корреляционный анализ выявил ряд как положительных, так и отрицательных взаимосвязей, характерных в наибольшей степени для основных компонентов биосинтеза белка (АРУЦ) и гликокаликса (треонин, серин), а также обеспечивающих поступление в циркуляцию биологически важных биорегуляторов (ароматические аминокислоты, триптофан, аргинин, аланин), аспарагином, гистидином, глицином и лизином.

Список литературы

1. Butterworth, R. F. Hepatoprotection by L-Ornithine L-Aspartate in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease / R.F. Butterworth, A. Canbat // J. of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. — 2019. — Vol. 1, № 29. — P. 24–30.
2. De AguiarVallim, T. Q. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism / T.Q. De AguiarVallim, E.J. Tarling, P.A. Edwards // Cell Metab. — 2013. — Vol. 17. — P. 657–669.
3. Meroni, M. Alcohol or Gut Microbiota: Who Is the Guilty? / M. Meroni, M. Longo, P. Dongiovanni // J. Ann Hepatol. — 2019. — J. Mol. Sci. — 2019. — Vol. 20, № 18. — P. 4568.
4. Molecular mechanisms of glutamine action / R. Curi [et al.] // J Cell Physiol. — 2005. — Vol. 204, № 2. — P. 392–401.
5. Regulation of intestinal protein metabolism by amino acids / J. Bertrand [et al.] // Amino Acids. — 2013. — № 45(3). — P. 443–50.
6. Role of DNA methylation and folate metabolism in the development of pathological processes in the human body / T.A. Shumatova [et al.] // J. Pacific Medical. — 2013. — № 4. — P. 39–43.
7. Sarin, S.K. Microbiome as a therapeutic target in alcohol-related liver disease / S.K. Sarin, A. Pande, B. Schnabl // J. Hepatol. — 2019. — Vol. 70. — P. 260–272.
8. Stoll, B. Intestinal uptake and metabolism of threonine: nutritional impact / B. Stoll // Advances in Pork Production. — 2006. — Vol. 17 — P. 257–263.
9. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism / E.P. Neis [et al.] // Nutrients. — 2015. — Vol. 7, № 4. — P. 2930–2946.
10. Vance, J. E. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells / J. E. Vance, G. Tasseva // Biochim. Biophys. Acta. — 2013. — Vol. 1831, № 3. — P. 543–554.

CHANGES OF FREE AMINO ACIDS IN THE MICROBIAL-TISSUE COMPLEX OF THE THIN INTESTINE AND LIVER IN THE DYNAMICS OF ALCOHOL INTOXICATION

Nikolaeva I.V., Smirnov V.Y., Sheibak V.M.

*Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The effect of intragastric administration of ethanol on the pool of free amino acids of the microbial-tissue complex of the small intestine and rat liver was studied. When ethanol was administered at a narcotic dose (4.5 g / kg), the content of glutamate, asparagine, alanine in enterocytes and glutamine in the liver increased, which indicates an increase in their use as energy substrates, and a relative increase in the total amount of essential amino acids, including BCCA, may indicate inhibition of protein synthesis.*

РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПУЛА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СЕРСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА НА ФОНЕ МЕТИОНИНОВОЙ НАГРУЗКИ

Новгородская Я.И.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Ингибирование фолатного цикла на фоне длительной метиониновой нагрузки вызывает повышение уровней серосодержащих аминокислот во всех исследованных структурах головного мозга крыс, в наибольшей степени — в больших полушариях, в наименьшей — в стриатуме. Они проявлялась в повышении активности первой реакции транссульфурирования, высокой нагрузке гипотаурина на фоне незначительного повышения синтеза таурина.

Введение. Повышенный уровень гомоцистеина в плазме крови ассоциируют с неврологическими нарушениями (болезнью Альцгеймера, Паркинсона, синдромом Дауна, депрессиями, деменцией и когнитивными нарушениями). Имеются работы, которые подтверждают вклад гипергомоцистеинемии в нарушение функционирования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Установлено, что проницаемость ГЭБ повышается на 25 % в больших полушариях мозга у мышей с дефицитом цистатионин-β-синтазы, находящихся на гипергомоцистеинемической диете [8]. Лечение витаминами группы В нормализует функционирование ГЭБ у пациентов с гипергомоцистеинемией и легкими когнитивными нарушениями [11]. В 2011 г. стало известно, что гомоцистеин повышает проницаемость ГЭБ через активацию NMDA-рецепторов [6], что может способствовать прогрессированию нейродегенеративных заболеваний. Дефицит фолатов во время беременности вызывает не только повышение уровня гомоцистеина в печени, но и поведенческие расстройства у потомства, которые также сопровождаются повышением уровня гомоцистеина в мозжечке, гиппокампе, среднем мозге и больших полушариях мозга крысят [9]. Дефицит фолиевой кислоты оказывает влияние и на пролиферацию нервных клеток, и на везикулярный транспорт, и на синаптическую пластичность с долгосрочными эффектами на обучение и память [7].

Метотрексат широко используется как в практической медицине, так и экспериментальных исследованиях. Его действие заключается в ингибировании дегидрофолатредуктазы и ряда других ферментов, вовлеченных в метиониновый цикл [4]. При ингибировании метотрексатом дегидрофолатредуктазы нарушается превращение 5-метилтетрагидрофолиевой в тетрагидрофолиевую кислоту, а следовательно, тормозится и перенос одноуглеродных групп на различные субстраты. Однако в литературе практически отсутствуют сведения об уровнях серосодержащих аминокислот и родственных соединений при ингибировании фолатного цикла метотрексатом в условиях гипергомоцистеинемии, которая имеет место при неврологических расстройствах.

Цель работы — установить характер влияния метотрексата, вводимого на фоне гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой, на уровни серосодержащих аминокислот, а также метаболически связанных с ними серина и глицина в головном мозге крыс.

Материалы и методы исследования. Эксперимент выполнен на 18 крысах-самцах массой 200–250 г, содержащихся на обычном рационе вивария со свободным доступом к воде.

Проведение эксперимента соответствовало правилам и нормам гуманного обращения с подопытными животными (приказ Минздрава Республики Беларусь № 274 от 17.04.2006 г.) и одобрено комитетом по биомедицинской этике учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол № 1 от 30.01.2018).

Опытной группе крыс внутривентрикулярно вводили метотрексат в дозе 0,1 мг/кг [5] через день и внутривентрикулярно суспензию L-метионина в 1%-м крахмальном растворе в суточной дозе 3 г/кг в течение 21 суток с целью моделирования гипергомоцистеинемии [3]. Контрольная группа получала эквивалентное количество жидкостей. За 12 часов до декапитации животных лишали пищи. После декапитации у животных извлекали головной мозг и выделяли отделы (большие полушария, стриатум, средний мозг, гипоталамус, мозжечок). Плазму крови отделяли центрифугированием при 2000 g. В хлорнокислых экстрактах ткани мозга определяли концентрации цистеиновой кислоты (CA), цистеинсульфиновой кислоты (CSA), серина (Ser), глицина (Gly), гипотаурина (HpTau), таурина (Tau), метионина (Met), цистатионина (Ctn), гомоцистеиновой кислоты (HCA) методом обращенно-фазной ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой [1]. Определение гомоцистеина (Hcy) в плазме крови крыс проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ после предколоночной дериватизации SH-содержащих соединений с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом [2].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы *Statistica* 10.0 с применением описательной статистики и контролем нормальности с помощью критерия Колмогорова – Смирнова с поправкой Лиллифорса. При отклонении распределения от нормального или выявлении существенного различия дисперсий в группах достоверность различий между группами проверяли медианным тестом Манна – Уитни, различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Результаты выражали в виде среднего и средней ошибки среднего ($M \pm m$), а для показателей, имеющих различия между группами, достоверные только по непараметрическому тесту — медианы, нижней и верхней квартили (Me [нижняя; верхняя квартили]).

Результаты исследования и их обсуждение. Ингибирование фолатного цикла на фоне метиониновой нагрузки вызывало повышение уровня Hcy в плазме крови с $9,50 \pm 0,60$ до $77,5 \pm 11,21$ мкмоль/л (здесь и далее $p < 0,05$). При этом наблюдались однонаправленные эффекты во всех исследованных структурах головного мозга крыс, которые проявлялись в повышении уровней *Met*, *HpTau* и *Ctn* (табл. 1–3).

Таблица 1 — Уровни серосодержащих аминокислот и родственных им соединений в гипоталамусе и мозжечке крыс после ингибирования фолатного цикла на фоне метиониновой нагрузки

Показатель	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
	Гипоталамус		Мозжечок	
CA	7,92 ± 0,653	7,94 ± 0,223	1,142 ± 0,127	1,23 ± 0,263
CSA	2,43 ± 0,158	2,93 ± 0,223	3,35 ± 0,434	2,00 ± 0,294*
HCA	26,27 ± 2,314	26,85 ± 1,373	7,02 ± 0,385	8,81 ± 1,428
Ser	340,39 ± 13,721	287,78 ± 9,806*	624,79 ± 20,710	361,74 ± 30,00*
Gly	2548,91 ± 241,367	2363,71 ± 178,784	638,91 ± 46,467	660,41 ± 54,414
HpTau	21,37 ± 1,669	259,76 ± 28,673*	24,19 ± 4,060	202,26 ± 41,711*
Tau	1319,50 ± 74,522	1866,31 ± 73,321*	3495,01 ± 123,047	3951,13 ± 349,085
Met	29,98 ± 1,220	160,78 ± 45,140*	29,05 ± 1,329	108,53 ± 21,160*
Ctn	104,29 ± 17,081	743,53 ± 136,948*	647,77 ± 34,970	4015,63 ± 593,563*

* статистически достоверные различия в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 2 — Уровни серосодержащих аминокислот и родственных им соединений в больших полушариях и среднем мозге крыс после ингибирования фолатного цикла на фоне метиониновой нагрузки

Показатель	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
	Большие полушария		Средний мозг	
CA	1,12 ± 0,127	1,22 ± 0,174	1,21 ± 0,138	1,35 ± 0,128
CSA	0,73 ± 0,165	1,18 ± 0,335	2,79 ± 0,638	2,94 ± 0,286
HCA	10,14 ± 1,723	9,14 ± 0,629	6,87 ± 1,026	3,40 ± 0,449*
Ser	916,85 ± 52,044	538,89 ± 37,266*	443,42 ± 32,820	354,22 ± 23,234
Gly	912,97 ± 57,394	738,82 ± 41,209*	2451,14 ± 190,263	2047,78 ± 94,761
HpTau	77,27 ± 15,064	1506,56 ± 233,750*	45,51 ± 17,790	480,97 ± 65,384*
Tau	4860,27 ± 182,660	5799,61 ± 125,378*	2107,70 ± 176,369	2597,55 ± 110,949*
Met	38,44 ± 2,609	212,71 ± 60,360*	40,3 [35,30;48,34]	240,5 [66,0;409,0]*
Ctn	26,64 ± 3,246	149,42 ± 21,929*	91,71 ± 8,191	266,45 ± 29,173*

* статистически достоверные различия в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

Уровень *Ser* достоверно снижался в гипоталамусе, мозжечке, больших полушариях и стриатуме (в среднем мозге имелась лишь тенденция к снижению). Подобные изменения могут указывать на нарушение транссульфурирования, проявляющегося в активации его первой реакции и торможении — второй. В пользу этого говорит снижение уровня *Ser* и накопление продукта реакции конденсации серина и гомоцистеина — *Ctn*. Существует представление, что в головном мозге активность цистатионин-γ-лиазы снижена, следовательно, нагрузка метионином, приводит к обогащению пула НСС в головном мозге, несмотря на введение антагониста фолиевой кислоты. Известно, что синтез *Ser* и *Gly de novo* снижается в мозге при дефиците витамина В₆, который играет важную роль в метаболизме развивающегося мозга [4]. Уровень *Tau* достоверно повышался лишь в гипоталамусе, больших полушариях и среднем мозге (уровень *Tau* в стриатуме и мозжечке изменялся в том же направлении).

Следует отметить, что синтез *Tau* осуществляется преимущественно за счет декарбоксилирования *CA*, а не окисления *HpTau*, так как уровень последнего существенно увеличивался по сравнению с имеющимся увеличением уровня *Tau* (большие полушария > стриатум > гипоталамус > средний мозг > мозжечок).

Таблица 3 — Уровни серосодержащих аминокислот и родственных им соединений в стриатуме крыс после ингибирования фолатного цикла на фоне метиониновой нагрузки

Показатель	Контроль	Опыт
	Стриатум	
CA	1,66 ± 0,331	1,33 ± 0,232
CSA	1,25 ± 0,166	1,07 ± 0,125
HCA	6,93 ± 0,828	6,60 ± 0,508
Ser	712,63 ± 52,718	468,28 ± 40,825*
Gly	746,45 ± 72,846	643,64 ± 64,886
HpTau	52,90 ± 4,401	926,93 ± 143,837*
Tau	6149,82 ± 374,107	8146,48 ± 655,7893
Met	37,29 ± 2,631	230,96 ± 62,399*
Ctn	53,10 ± 3,094	298,78 ± 47,812*

* статистически достоверные различия в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

Исследования М. I. Verrocal-Zaragoza [6] демонстрируют повышение уровня *Hcy* в мозге крысят, имеющих фолатный дефицит. В этой работе уровень *Hcy* уменьшается в ряду: мозже-

чок > гиппокамп > средний мозг > большие полушария. Установлено, что *Hcy* накапливается и в нейронах, и в астроцитах избирательно: гиппокампе (в пирамидальном слое CA1), мозжечке (в зернистом слое), стриатуме, субвентрикулярной зоне, выстилающей боковой желудочек [3]. Также известно, что метотрексат ингибирует и метионинсинтазу [4], что может объяснить высокие уровни *Hcy* в мозге и в наших исследованиях. О снижении активности последнего фермента говорят и результаты исследований на крысах с дефицитом фолатов [10]. На основании этих исследований можно предположить, что менее уязвимой структурой головного мозга в отношении токсического действия *Hcy*, вероятно, является средний мозг. Так, в нашем исследовании уровень *Ser* имеет там лишь тенденцию к снижению, а уровень *Ctn* — основного продукта первой реакции транссульфурирования, повышается в наименьшей степени по сравнению с другими исследованными структурами головного мозга крыс.

Заключение. При ингибировании фолатного цикла на фоне гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой, наблюдается повышение уровней серосодержащих аминокислот (в большей степени *Met*, *Ctn*, *HpTau*, в меньшей — *Ser* и *Tau*) во всех исследованных структурах головного мозга крыс. Наибольшее количество сдвигов зарегистрировано в больших полушариях мозга крыс. Степень нарушений обмена серосодержащих аминокислот в стриатуме была несколько ниже, чем в других отделах мозга, но они также проявлялись в повышении активности первой реакции транссульфурирования, активной наработке гипотаурина на фоне незначительного повышения синтеза таурина.

Список литературы

1. Дорошенко, Е.М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности // Е.М. Дорошенко, В.А. Снежицкий, В.В. Лелевич / Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2017. — Т. 15, № 5. — С. 552.
2. Дорошенко, Е.М. Лабораторно-диагностическая технология одновременного определения в пробе анализируемого материала (ткани, биологической жидкости) гомоцистеина и других физиологически активных аминокислот с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е.М. Дорошенко, Я.И. Новгородская // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2020. — Т. 9, № 1–2. — С. 135–143.
3. Медведев, Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, Д.В. Звягина, М. А. Фомина // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. — 2014. — № 4. — С. 42–46.
4. Новгородская, Я.И. Влияние антагониста фолиевой кислоты метотрексата на концентрации серосодержащих соединений в плазме крови крыс / Я.И. Новгородская, М.Н. Курбат // Вестник Гродненского государственного университета имени Янки Купалы. Серия 5. Экономика. Социология. Биология. — 2018. — Т. 8, № 1. — С. 133–140.
5. Фолатзависимые механизмы гепатотоксичности этанола при хронической алкогольной интоксикации / П.С. Пронько [и др.] // Фундаментальные науки — медицине: материалы Международ. науч. конф. (Минск, 17 мая 2013 г.): в 2 ч. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т физиологии; редкол.: И.В. Залуцкий [и др.] — Минск: Беларус. навука. — 2013. — Ч. 2. — С. 166–170.
6. Beard, R.S. Hyperhomocysteinemia increases permeability of the blood-brain barrier by NMDA receptor-dependent regulation of adherens and tight junctions / R.S. Beard, J.J. Reynolds, S.E. Bearden // Blood. — 2011. — Vol. 118, № 7. — P. 2007–2014.
7. Daval, J.L. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat / J.L. Daval, S. Blaise, J.L. Gueant // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2009. — Vol. 106, № 1. — P. E1.

8. Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice / F. Atul [et al.] // *Blood*. — 2006. — Vol. 107, № 2. — P. 591–593.
9. Folate deficiency in rat pups during weaning causes learning and memory deficits / M. I. Berrocal-Zaragoza [et al.] // *British Journal of Nutrition*. — 2014. — Vol. 112, № 8. — P. 1323–1332.
10. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats / S.A. Blaise [et al.] // *The American Journal of Pathology*. — 2007. — Vol. 170, № 2. — P. 667–679.
11. Vitamin B₆ is essential for serine de novo biosynthesis / R.J. Ramos [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* — 2017. — Vol. 40, № 6. — P. 883–891.
12. Vitamin B₁₂-B₆-folate treatment improves blood-brain barrier function in patients with hyperhomocysteinaemia and mild cognitive impairment / M. Lehmann [et al.] // *J. Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* — 2003. — Vol. 16, № 3. — P. 145–150.

REGIONAL FEATURES OF THE POOL OF LOW-MOLECULAR WEIGHT SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS IN THE BRAIN OF RATS AFTER INHIBITING OF FOLATE CYCLE DURING PROLONGED METHIONINE LOAD

Novogrodskaya Ya.I.

*Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *Inhibition of the folate cycle under conditions of prolonged methionine load caused an increase in the levels of sulfur-containing amino acids in all the rat brain structures studied, being the most pronounced in the brain cortex, and the least distinct in the striatum. They were expressed as an increased activity of the first reaction of transsulfuration, high production of hypotaurine, with taurine synthesis being slightly increased.*

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА Н1/Н2 ГЕНА P2RY12 НА РАЗВИТИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КЛОПИДОГРЕЛУ У ПАЦИЕНТОВ СО СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИЕЙ НАПРЯЖЕНИЯ

Пронько Т.П., Горчакова О.В.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Цель исследования — оценить влияние полиморфного варианта Н1/Н2 гена P2RY12 на развитие резистентности к клопидогрелу у пациентов Гродненского региона со стабильной стенокардией напряжения (ССН), подвергшихся процедуре планового чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ). В исследование включено 92 пациента со ССН от 40 до 72 лет. Выявлено, что частота встречаемости генотипов Н1/Н2 и Н2/Н2 гена P2RY12, ассоциированных с возможной вариабельностью ответа на терапию клопидогрелем составила 40,2 %. Получена ассоциация полиморфизма Н1/Н2 гена P2RY12 с эффективностью клопидогрела.

Введение. Двойная антитромбоцитарная терапия (ДАТТ) является основополагающей для снижения риска развития сердечно-сосудистых событий. ДАТТ состоит из комбинации ацетилсалициловой кислоты (АСК) и блокатора рецепторов аденозиндифосфата (АДФ) P2Y12 тромбоцитов — клопидогрела. Одна из существенных проблем применения ДАТТ у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) заключается в развитии резистентности к указанным лекарственным средствам (5–48 % к ацетилсалициловой кислоте (АСК) и 20–30 % к клопидогрелу), которая ассоциирована с высоким риском смерти, инфаркта миокарда или инсультов [4, 14]. Механизмы резистентности к ДАТТ многогранны и обусловлены сочетанием биологических, клинических, генетических и фармакологических факторов, оказывающих влияние на функциональную активность тромбоцитов [8, 15]. Достаточно привлекательной выглядит генетическая теория развития резистентности к ДАТТ.

Тромбоцитарные рецепторы АДФ — P2Y1 и P2Y12 играют большую роль в функционировании, активации и необратимой агрегации тромбоцитов и являются терапевтической мишенью клопидогреля [12]. P2Y12 спарен с Gi-рецептором и при активации под действием АДФ ингибирует аденилатциклазу и обеспечивает снижение уровня цАМФ. Это приводит к экспрессии GPIIb/IIIa на поверхности тромбоцитов и активации агрегации. В гене P2Y12 было выявлено 4 мутации: 3 аминокислотные замены С139Т, Т744С, G52Т и одну вставку ins801А. Все 4 варианта полиморфизма наследуются сцеплено и обуславливают формирование двух гаплотипов Н1 (С139, Т744, G52 и отсутствие вставки) и Н2-гаплотип (139Т, 744С, 52Т, ins801А) [3]. Гаплотип Н2 ассоциируется с гиперактивностью тромбоцитов и развитием острых тромбоцитарных нарушений в связи с ослабленным ответом на антитромбоцитарную терапию [2, 11], выявлена взаимосвязь наличия гаплотипа Н2 с развитием периферического атеросклероза [9], ИБС, особенно у некурящих пациентов [6], а также инфаркта миокарда [2]. Отмечена повышенная агрегационная активность тромбоцитов в ответ на АДФ и у здоровых носителей гаплотипа Н2 гена P2RY12, что является фактором риска развития атеротромбоза [3].

Следует отметить, что сочетание генетических факторов риска и сила их влияния на риск развития тромбоцитарных осложнений в разных исследованиях, проведенных в отдельных регионах, могут различаться, поэтому изучение распределения генетических полиморфизмов и их

взаимосвязь с агрегационными свойствами тромбоцитов у пациентов со ССН, проживающих в Гродненском регионе представляет безусловный интерес.

Материалы и методы исследования. В исследование включено 92 пациента со ССН от 40 до 72 лет, средний возраст — $59,4 \pm 6,8$ лет, из них 21 женщина и 71 мужчина, проходивших обследование и лечение на базе Гродненского областного клинического кардиологического центра и реабилитацию на базе Гродненской областной клинической больницы медицинской реабилитации. Все обследуемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании, протокол которого был одобрен комитетом по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета № 3 от 13.01.2016.

Критерии включения в исследование: наличие ССН, информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения: наличие острого инфаркта миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, тромбоэмболия легочной артерии, тромбоз вен нижних конечностей, наличие фибрилляции/трепетания предсердий, хроническая сердечная недостаточность III и выше (III функциональный класс (ФК) по NYHA), наличие сопутствующих острых воспалительных и онкологических заболеваний, активное внутреннее кровотечение, анемии различного генеза, количество тромбоцитов менее 180 тыс./мкл, выраженная почечная и печеночная недостаточность, отказ от участия в исследовании.

Процедуре планового ЧКВ с постановкой стентов подвергались 89 пациентов, 3 пациентам проводилась коронарография без постановки стентов. У 60 пациентов (67,4 %) стенты были с лекарственным покрытием, у 29 (32,6 %) — без лекарственного покрытия. Все пациенты принимали бета-блокаторы (бисопролол 5–10 мг или метопролол 50–100 мг), ингибиторы АПФ (лизиноприл 5–20 мг или рамиприл 5–10 мг), статины (аторвастатин 10–20 мг или розувастатин 5–20 мг), ацетилсалициловую кислоту (АСК) 75 мг, клопидогрель 75 мг, молсидомин при болях за грудиной. Часть пациентов (70 человек) получала лансопризол 30 мг.

Все исследования проводились через 14 дней после проведения ЧКВ и коронарографии.

По стандартной методике выполнялись сбор анамнестических данных, физикальное обследование, ЭКГ, эхокардиография, коронароангиография для всех пациентов, включенных в исследование.

Экстракция геномной ДНК проводилась из образцов цельной крови с использованием наборов реагентов «ДНК-ЭКСТРАН-1» и «Проба экспресс», НПК «Синтол», РФ. В основе метода лежит высвобождение ДНК от биополимеров и осаждение клеточного дебриса за счет химического, физического и термического воздействия. Определение аллельных вариантов генотипа АДФ рецептора тромбоцитов P2 RY12, H1\H2 выполнено SNP-методом с аллель-специфичными праймерами и использованием комплекта реагентов ООО НПФ «Литех» (РФ), на амплификаторе термоциклере Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (США). Распределение продуктов амплификации проводилось методом горизонтального гель-электрофореза, с последующей детекцией в камере транслюминатора Gel Doc™ XR+ Bio Rad (США) и применением интеркалирующего красителя 1%-ного бромистого этидия.

Оценку агрегации тромбоцитов проводили при помощи мультиэлектродной агрегометрии на импедансном 5-канальном агрегометре *Multiplate* (*Verum Diagnostica GmbH*, Германия) с несколькими индукторами агрегации. Аденозин-5'-дифосфат (АДФ) (ADP-test) — для выявления чувствительности к клопидогрелю, арахидоновая кислота (ASPI-test) — для выявления чувствительности к АСК, пептид активатор тромбин рецепторов (Трап-6) — для отражения потенциальной способности тромбоцитов к агрегации. Построение агрегатограмм и расчет результатов

проводились автоматически. Основным параметром является площадь под агрегационной кривой (*area under curve* — AUC). Данный показатель наиболее полно отражает тромбоцитарную активность. Переменная AUC представлена в виде единиц (*unit* — U) [5].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10.0. Проверку на нормальность распределения проводили с помощью теста Колмогорова – Смирнова и критерия Лиллиефорса (при $p < 0,05$ распределение признака считали отличающимся от нормального). Полученные результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$) при нормальном распределении, в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей ($Me [LQ; UQ]$) при распределении, отличающемся от нормального. Две независимые группы сравнивали с помощью U-критерия Манна — Уитни. При сравнении долей (процентов) использовался точный тест Фишера. Проводился непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Статистически значимыми различия в группах были приняты на уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Распределение распространенности генотипов полиморфного локуса H1/H2 гена P2RY12 в обследуемой группе соответствовало ожидаемому равновесию Харди – Вайнберга, $\chi^2 = 0,32$; $p = 0,57$. Носители генотипа H1/H1 составили 59,8 % (55 человек), носители генотипа H1/H2 составили 33,7 % (31 человек), носители генотипа H2/H2 составили 6,5 % (6 человек). Частота встречаемости аллели H1 — 77 %, частота встречаемости аллели H2 — 23 %. Распространенность носительства генотипов, ассоциированных с возможной вариабельностью ответа на терапию клопидогрелем, среди пациентов со стабильной стенокардией составила 40,2 %.

Согласно данным российских коллег в выборке пациентов с ИБС Западно-Сибирского региона носители генотипа H1/H1 составили 75,9 %, носители генотипа H1/H2 — 22,9 %, генотипа H2/H2 — 1,2 % [1]. Согласно данным итальянских исследователей, у пациентов с ИБС также преобладали лица с генотипом H1/H1 до 83 %, гетерозигота встречалась в 18 %, мутантная гомозигота — в 1 % случаев [13]. В данных исследованиях частота носителей генотипа H1/H1 была выше по сравнению с нашими данными. У пациентов с ИБС немецкой популяции частота встречаемости генотипов H1/H2 и H2/H2 были сопоставимы с нашими данными [10].

Включенные в исследование пациенты были разделены на подгруппы. Подгруппу 1 (ПГ1) составили носители генотипа H1/H1 гена P2RY12 (55 человек), в подгруппу 2 (ПГ2) были включены 37 человек, обладатели генотипов H1/H2 и H2/H2.

Как видно из таблицы, в ПГ2 отмечались более высокие значения ADP-test, тогда как значения TRAP-test были сопоставимы.

Таблица — Показатели импедансной агрегометрии в подгруппах с разными полиморфными вариантами гена P2RY12

Показатель	Площадь под кривой (AUC), U	
	ПГ1	ПГ2
ASPI-test	22,0 [13,0; 34,5]	27,0 [16,0; 50,5]
ADP-test	40,0 [24,5; 49,5]	46,0 [27,5; 66,0] *
TRAP-test	86,5 [75,0; 108,5]	101,5 [78,0; 113,0]

Примечание: * — достоверные отличия между исследуемыми группами, где * — $p < 0,05$.

Согласно инструкции по работе на приборе *Multiplate* при приеме клопидогрела, отрезная точка показателя ADP-test агрегатограммы ниже 50 U [5]. В ПГ1 было 9 человек (16,4 %) со

значениями ADP-test выше 50 U, что означает наличие сниженной чувствительности к клопидогрелу, в ПГ2 — таких было 15 человек (40,5 %), ($p = 0,015$ по точному тесту Фишера). При проведении корреляционного анализа выявлена статистически значимая ассоциация между значениями ADP-test и носительством аллеля H2 гена P2RY12 ($R_s = 0,21$; $p < 0,05$).

В нашей работе мы не выявили ассоциации между наличием гаплотипа H2 и резистентностью к АСК, тогда как согласно данным казахских коллег такая связь присутствовала [7]. Мы также не выявили ассоциации гаплотипа H2 с исходной функциональной активностью тромбоцитов.

Заключение. Среди пациентов Гродненского региона со стабильной стенокардией напряжения, частота встречаемости генотипов H1/H2 и H2/H2 гена P2RY1, ассоциированных с возможной вариабельностью ответа на терапию клопидогрелом составила 40,2 %. Выявлена ассоциация полиморфизма H1/H2 гена P2RY12 с эффективностью клопидогрела у пациентов со стабильной стенокардией напряжения, подвергшихся процедуре планового ЧКВ.

Список литературы

1. Ассоциация полиморфизмов генов ITGB3, P2RY12, CYP2C19 с функциональной активностью тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца на фоне двухкомпонентной антиагрегантной терапии / Э.Ф. Муслимова [и др.] // Терапевтический архив. — 2017. — № 5. — С. 74–78.
2. Генетические варианты АДФ-рецептора тромбоцитов P2Y12, ассоциированные с изменением функциональной активности тромбоцитов и развитием сердечно-сосудистых заболеваний / О.В. Сироткина [и др.] // Генетика. — 2009. — Т. 45, № 2. — С. 247–253.
3. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects / P. Fontana [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 108. — P. 989–995.
4. Bleeding and stent thrombosis on P2Y12 inhibitors: collaborative analysis on the role of platelet reactivity for risk stratification after percutaneous coronary intervention / D. Aradi [et al.] // J. European Heart. — 2015. — Vol. 36. — P. 1762–1771.
5. Calatzis, A. Multiplate platelet function analysis — application and interpretation / A. Calatzis, R. Loreth, M. Spannagl // Verum Diagnostica GmbH, 2007. — P. 1–35.
6. Gene sequence variations of the platelet P2Y12 receptor are associated with coronary artery disease / U. Cavallari [et al.] // BMC Medical Genetics. — 2007. — Vol. 8, № 59. — P. 1–6.
7. Karazhanova, L. Association between the P2RY12 receptor gene polymorphism and aspirin resistance in patients with coronary artery disease / L. Karazhanova, S. Zhukusheva, A. Akilzhanova // Central Asian Journal of Global Health. — 2014. — Vol. 3. — P. 20–21.
8. Novel aspects of antiplatelet therapy in cardiovascular disease / T. Gremmel [et al.] // Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. — 2018. — Vol. 2, № 3. — P. 439–449.
9. P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease. A case-control study / P. Fontana [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 108, № 24. — P. 2971–2973.
10. P2Y12 polymorphisms and antiplatelet effects of aspirin in patients with coronary artery disease / A. Bierend [et al.] // British J. of Clinical Pharmacology. — 2008. — Vol. 65, № 4. — P. 540–547.
11. Peripheral artery disease and the risk for ischemic cerebrovascular events in patients with P2Y12 association of a functional polymorphism in the clopidogrel target receptor gene / Mannhalter C. Mlekusch [et al.] // Stroke. — 2005. — Vol. 36. — P. 1394–1399.
12. Purinergic receptor P2Y, G protein coupled, 12 gene variants and risk of incident ischemic stroke, myocardial infarction, and venous thromboembolism / R.Y. Zee [et al.] // Atherosclerosis. — 2008. — Vol. 197, №2. — P. 694–699.
13. Routine assessment of on-clopidogrel platelet reactivity and gene polymorphisms in predicting clinical outcome following drug-eluting stent implantation in patients with stable coronary artery

disease / C.V. Anselmi [et al.] // JACC: Cardiovascular Interventions. — 2013. — Vol. 6, № 11. — P. 1166–1175.

14. Warlo, E.M.K. A brief review on resistance to P2Y₁₂ receptor antagonism in coronary artery disease / E.M.K. Warlo, H. Arnesen, I. Seljeflot // J. Thrombosis. — 2019. — Vol. 17, № 1. — P. 2–9.

15. Würtz, M. Aspirin in coronary artery disease: an appraisal of functions and limitations / M. Würtz // J. Danish Medical. — 2015. — Vol. 62, № 4. — P. 1–23.

INFLUENCE OF THE POLYMORPHIC VARIANT H1 / H2 OF THE P2RY12 GENE ON THE RESISTANCE TO CLOPIDOGREL IN PATIENTS WITH STABLE STENOCARDIA

Pronko T.P., Gorchakova O.V.

*Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The aim of the study was to evaluate the effect of the polymorphic variant H1 / H2 of the P2RY12 gene on the development of clopidogrel resistance in patients of the Grodno region with stable stenocardia (SS) who underwent elective percutaneous coronary intervention (PCI). The study included 92 patients with SS aged 40 to 72 years. It was revealed that the frequency of occurrence of the H1 / H2 and H2 / H2 genotypes of the P2RY1 gene, associated with a possible variability in response to clopidogrel therapy, was 40.2 %. An association of the H1 / H2 polymorphism of the P2RY12 gene with clopidogrel efficacy was obtained.*

РОЛЬ ТРИПТОФАНА В ПАТОГЕНЕЗЕ И ЛЕЧЕНИИ АЛКОГОЛИЗМА

Разводовский Ю.Е.

*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. В настоящей работе представлен обзор литературных данных, посвященных роли триптофана в патогенезе и лечении алкоголизма. Хроническая алкогольная интоксикация и синдром отмены алкоголя сопровождаются нарушением обмена триптофана. Снижение активности центральной серотонинергической системы вследствие снижения доступности триптофана в мозге является одним из патогенетических механизмов синдрома отмены алкоголя. Целесообразным является включение триптофана в протокол лечения синдрома отмены алкоголя с целью купирования инсомнических и депрессивных нарушений. Триптофан также может быть использован в качестве средства, снижающего алкогольную мотивацию.

Триптофан является наиболее изученной аминокислотой в плане перспективы использования с целью метаболической коррекции последствий хронической алкогольной интоксикации [3]. В первую очередь это объясняется тем, что триптофан является предшественником серотонина, нарушение обмена которого играет важную роль в патогенезе алкогольной зависимости [6]. В моделях на животных было установлено, что однократное введение алкоголя вызывает двухфазный эффект на оборот серотонина в мозге: первоначальное повышение с последующим снижением [19]. Однократное употребление алкоголя сопровождается снижением экскреции с мочой метаболита серотонина 5-гидроксииндолилуксусной кислоты и одновременным ростом экскреции 5-гидрокситриптофола вследствие сдвига деградации серотонина с основного оксидативного пути к минорному восстановительному [20]. В настоящее время соотношение концентраций 5-гидрокситриптофола и 5-гидроксииндолилуксусной кислоты используется в качестве маркера недавнего однократного употребления алкоголя [16].

Хроническая алкогольная интоксикация вызывает значительное снижение уровня серотонина в головном мозге [20]. Уровень основного метаболита серотонина 5-гидроксииндолилуксусной кислоты в моче и спинномозговой жидкости у алкоголиков значительно ниже, чем у здоровых людей [18]. Предполагается, что хроническая алкогольная интоксикация сопровождается снижением уровня серотонина в головном мозге за счет уменьшения продукции медиатора, а также замедления его синоптического выброса и деградации [7, 22]. Это может быть следствием токсического влияния этанола на серотонинергические нейроны [20]. Однако точный механизм, ответственный за снижение уровня серотонина в головном мозге при хронической алкогольной интоксикации, неизвестен. В настоящее время установлено, что одна из вариаций гена, кодирующего фермент триптофангидроксилазу, встречается у алкоголиков с агрессивным поведением и суицидальными тенденциями [11]. Синдром отмены этанола, являющийся эпифеноменом алкогольной зависимости, также сопровождается снижением активности серотониновой системы в головном мозге [3].

Связь между уровнем серотонина и потреблением алкоголя исследована на животных с различным предпочтением к алкоголю. У предпочитающих алкоголь крыс, по сравнению

с предпочитающими воду, уровень серотонина и его метаболитов ниже в различных отделах мозга [25]. Эти различия особенно выражены в *nucleus accumbens* — области мозга, вовлеченной в подкрепляющие эффекты алкоголя [20]. У предпочитающих алкоголь мышей линии C57B1 повышен базальный уровень триптофанпирролазы, что является причиной низкого уровня триптофана в плазме и серотонина в мозге [8, 9]. По всей видимости, предпочитающие алкоголь животные пытаются нормализовать уровень серотонина путем потребления алкоголя, острое введение которого, как известно, повышает уровень серотонина [16].

В последнее время накопилось много экспериментальных данных, указывающих на то, что подтипы серотониновых рецепторов 5-НТ (1А) и 5-НТ (1В) могут быть вовлечены в развитие толерантности и зависимости от алкоголя [10]. Важным свидетельством, доказывающим вовлеченность серотонина в развитие алкогольной зависимости, является исследование препаратов, влияющих на обратный захват серотонина (селективные ингибиторы обратного захвата серотонина). Экспериментальные и клинические исследования показали, что эти препараты снижают потребление алкоголя на 10–70 % [12]. Нарушение серотонинергической активности при алкогольной интоксикации и синдроме отмены алкоголя может быть опосредовано нарушением доступности предшественника серотонина — триптофана [5, 20].

Уровень триптофана в головном мозге является ключевой детерминантой скорости синтеза нейромедиатора в серотонинергической системе, поскольку при его снижении уменьшается насыщение субстратом скорость-лимитирующего фермента этого синтеза триптофангидроксилазы [6, 7]. Поскольку незаменимая аминокислота L-триптофан является предшественником серотонина, то ее дефицит ассоциируется со снижением центральной серотонинергической активности [15]. Низкое соотношение триптофан/большие нейтральные аминокислоты сочетается с тревожностью, антисоциальными чертами характера и ранним алкоголизмом [6, 7].

Диета с низким содержанием триптофана приводит к значительному снижению уровня триптофана в плазме, уровня серотонина в мозге, нарушению функционирования 5-НТ(2) рецепторов [14, 21], увеличивает потребление алкоголя крысами [7, 9]. Кроме того, такая диета вызывала рецидив депрессии у женщин с депрессивным эпизодом в анамнезе [14], усиливала депрессию у женщин с нервной булимией [13], снижала настроение и электрическую активность мозга у здоровых мужчин [11]. Назначение триптофана повышает уровень 5-оксииндолилуксусной кислоты во фронтальной коре, стриатуме, таламусе, стволе мозга и мозжечке [2], дозозависимо повышает синтез и деградацию серотонина, не влияя на обмен других нейротрансмиттеров [6]. Внутривенное введение L-триптофана на фоне синдрома отмены алкоголя в дозах 50 и 100 мг/кг купирует нарушения функционирования серотонинергической системы [1]. Установлено также, что внутримышечное введение L-триптофана уменьшает продолжительность бокового положения крыс на 35 %, а продолжительность этанол-индуцированного сна на 26 % [2].

Доступность триптофана в мозге определяется тремя основными факторами: активностью печеночной триптофанпирролазы, уровнем связывания триптофана белками плазмы, а также степенью его конкуренции с другими аминокислотами (валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, тирозин) за общую систему транспорта в головной мозг [6]. Следует отметить, что соотношение концентрации триптофана к концентрации конкурирующих аминокислот в плазме крови является более точным предиктором доступности триптофана в мозге, нежели собственно уровень триптофана [23].

Уровень триптофана в плазме крови и, следовательно, его доступность в мозге зависит от режима алкоголизации. Первоначальное повышение уровня серотонина в мозге на фоне однократ-

ного введения алкоголя вызвано повышением доступности свободно циркулирующего триптофана, что является следствием индуцированного катехоламинами липолиза и замещением неэстерифицированными жирными кислотами связанного с аминокислотами триптофана [4]. Последующее снижение уровня серотонина связано со снижением доступности триптофана в мозге в связи с активацией печеночной триптофанпирролазы [7]. В экспериментах на крысах показано, что хроническая алкогольная интоксикация сопровождается повышением уровня триптофана в плазме вследствие ингибирования активности печеночной триптофанпирролазы [7]. Значительно более высокий уровень свободного триптофана (на 117 %), а также общего триптофана (на 49 %) в плазме отмечен у больных алкоголизмом по сравнению со здоровыми субъектами [24].

Результаты клинического исследования, в котором приняли участие лица, страдающие алкогольной зависимостью, показали, что накануне развития алкогольного абстинентного синдрома соотношение свободного триптофана в плазме к сумме концентраций аминокислот, с которыми триптофан конкурирует за общие пути транспорта в головной мозг, выросло на 111 % [24]. При этом увеличение этого соотношения произошло за счет роста уровня триптофана, а не за счет снижения уровня конкурирующих аминокислот.

В то же время синдром отмены алкоголя сопровождается снижением синтеза и деградации серотонина, вызванного снижением доступности триптофана в мозге вследствие вызванной кортикостероидами индукции активности печеночной триптофанпирролазы [7]. Повышение активности триптофанпирролазы отмечается длительное время после проведения детоксикации, что может быть причиной бессонницы и депрессии в этот период [9]. Поскольку при синдроме отмены алкоголя угнетается активность центральной серотонинергической системы, причем в значительной степени за счет снижения доступности предшественника [7], целесообразным представляется использовать триптофан с целью коррекции аффективных нарушений, сопутствующих данному патологическому состоянию.

В клинических исследованиях показано, что назначение диеты, лишенной триптофана, усиливало патологическое влечение к алкоголю у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью [12]. В то же время дополнительное поступление триптофана в составе диеты повышало уровень серотонина, снижало уровень тревожности и уменьшало выраженность патологического влечения к алкоголю у пациентов с алкогольной зависимостью [19]. Основным механизмом снижения влечения к алкоголю в данном случае является повышение активности центральной серотонинергической системы [7]. Дополнительным механизмом может быть аверсивный эффект продуктов деградации триптофана по печеночному кинурениновому пути (3-гидрокскинуренин, кинурениновая кислота, 3-гидроксиантраниловая кислота), которые ингибируют активность митохондриальной альдегиддегидрогеназы в печени [8].

Заключение. Хроническая алкогольная интоксикация и синдром отмены алкоголя сопровождаются нарушением обмена триптофана. Одним из патогенетических механизмов синдрома отмены алкоголя является снижение активности центральной серотонинергической системы вследствие снижения доступности триптофана в мозге. Поэтому представляется целесообразным включение триптофана в протокол лечения синдрома отмены алкоголя с целью купирования инсомнических и депрессивных нарушений. Триптофан также может быть использован в качестве средства, снижающего алкогольную мотивацию.

Список литературы

1. Разводовский, Ю.Е. Влияние L-триптофана на продолжительность этанол-индуцированного сна / Ю.Е. Разводовский // Материалы научно-практической конференции молодых

- ученых и студентов, посвященной памяти академика Ю.М. Островского. — Гродно, 2003. — С. 185.
2. Разводовский, Ю.Е. Влияние L-триптофана на фонд центральных нейроактивных соединений при синдроме отмены этанола / Ю.Е. Разводовский, Е.М. Дорошенко // *Нейрохимия*. — 2004. — Т. 21, № 1. — С. 44–51.
 3. Разводовский, Ю.Е. Аминокислоты в патогенезе и лечении алкоголизма / Ю.Е. Разводовский // *Наркология*. — 2010. — № 6. — С. 88–97.
 4. Activation of liver tryptophan pyrrolase mediates the decrease in tryptophan availability to the brain after acute alcohol consumption by normal subjects / A.A. Badawy [et al.] // *J. Alcohol & Alcoholism*. — 2009. — Vol. 44, № 3. — P. 267–271.
 5. Acute effect of altered tryptophan levels and alcohol on aggression in normal human males. / R.O. Phil [et al.] // *Psychopharmacology*. — 1995. — Vol. 119, № 4. — P. 353–360.
 6. Badawy, A.A. Tryptophan and 5-hydroxytryptamine metabolism in alcoholism. / A.A. Badawy, C.J. Morgan, R. Thomas // *Alcohol & Alcoholism*. — 1993. — № 2. — P. 231–235.
 7. Badawy, A.A. Tryptophan metabolism in alcoholism / A.A. Badawy // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 1999. — Vol. 467. — P. 265–272.
 8. Badawy, A.A. Tryptophan in alcoholism treatment II: inhibition of the rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase activity, elevation of blood acetaldehyde concentration and induction of aversion to alcohol by combined administration of tryptophan and benserazide / A.A. Badawy, S. Bano, A. Steptoe // *Alcohol & Alcoholism*. — 2011. — Vol. 46, № 6. — P. 661–671.
 9. Badawy, A.A. Tryptophan in alcoholism treatment I: kynurenine metabolites inhibit the rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase activity, elevate blood acetaldehyde concentration and induce aversion to alcohol / A.A. Badawy, S. Bano, A. Steptoe // *J. Alcohol & Alcoholism*. — 2011. — Vol. 46, № 6. — P. 651–660.
 10. Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice / S. Kelai // *J. Neurochem.* — 2008. — Vol. 107, № 6. — P. 1660–1670.
 11. Decrease in circulation tryptophan availability to the brain after acute ethanol consumption by normal volunteers: implications for alcohol-induced aggressive behaviour and depression / A.A. Badawy [et al.] // *Pharmacopsychiatry*. — 1995. — Vol. 28, № 2. — P. 93–97.
 12. Effects of acute combined serotonin and dopamine depletion on cue-induced drinking intention/desire and cognitive function in patients with alcohol dependence / H.Q. Sun [et al.] // *Drug Alcohol Depend.* — 2012. — Vol. 124, № 3. — P. 200–2006.
 13. Effects of acute tryptophan depletion on mood in bulimia nervosa. / W.H. Kaye [et al.] // *J. Biological Psychiatry*. — 2000. — Vol. 47, № 2. — P. 151–157.
 14. Effects of acute tryptophan depletion on brain serotonin function and concentrations of dopamine and norepinephrine in C57BL/6J and BALB/cJ mice / C.S. Biskup [et al.] // *PLoS One*. — 2012. — Vol. 7, №5. — P. 32–36.
 15. Moroni, F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites / F. Moroni // *J. Pharmacology*. — 1999. — Vol. 375, № 1/3. — P. 87–100.
 16. Neurochemical markers of alcoholism vulnerability in humans / J.E. Rastma [et al.] // *J. Alcohol & Alcoholism*. — 2002. — Vol. 37, № 6. — P. 522–533.
 17. Predictive value of tryptophan/large neutral amino acids ratio to antidepressant response. / V. Lucini [et al.] // *J. Affect Disord.* — 1996. — Vol. 36, № 3/4. — P. 129–33.
 18. Sandyk, R. L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review / R. Sandyk // *Int. J. Neurosci.* — 1992. — Vol. 67, № 1/4. — P. 127–144.
 19. Serotonergic function, substance craving, and psychopathology in detoxified alcohol-addicted males undergoing tryptophan depletion / D. Wedekind [et al.] // *J. Psychiatry Research*. — 2010. — Vol. 44, №1. — P. 1163–1169.
 20. Serotonine dysfunction, negative mood states, and response to alcohol / A. Heinz [et al.]. — 2001. — Vol. 25, № 4. — P. 487–495.

21. Smith, K.A. Impaired regulation of brain serotonin function during dieting in women recovered from depression / K.A. Smith, C. Williams, P.J. Cower // *British J. of Psychiatry*. — 2000. — Vol. 176. — P. 72–75.
22. The effect of L-tryptophan on daytime sleep latency in normals: correlation with blood levels / C.F. George [et al.] // *Sleep*. — 1989. — Vol. 12, № 4. — P. 345–353.
23. Tryptophan in the treatment of late luteal phase dysphoric disorder: a pilot study / S. Steinberg [et al.] // *J. Psychiatry Neurosci*. — 1994. — Vol. 19, № 2. — P. 114–119.
24. Tryptophan metabolism in alcoholism. Tryptophan but not excitatory amino acids availability to the brain is increased before the appearance of the alcohol-withdrawal syndrome in men / A.A. Badawy [et al.] // *J. Alcohol & Alcoholism*. — 1998. — Vol. 33, № 6. — P. 616–625.
25. Tryptophan metabolism in male Sardinian alcohol-preferring (sP) and non-preferring (sNP) rats / S. Bano [et al.] // *J. Alcohol & Alcoholism*. — 1998. — Vol. 33, № 3. — P. 220–225.

THE ROLE OF TRYPTOPHAN IN THE PATHOGENESIS AND TREATMENT OF ALCOHOLISM

Razvodovsky Y.E.

*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *This article presents a review of the literature dealing with the role of tryptophan in the pathogenesis and treatment of alcoholism. Chronic alcohol intoxication and the withdrawal syndrome are accompanied by a disturbance in tryptophan turnover. The decrease in the activity of central serotonergic system as a consequence of availability of tryptophan in the brain is one of the pathogenic mechanisms of the alcohol withdrawal syndrome. It is reasonable to include tryptophan in the protocol of treatment of the alcohol withdrawal syndrome. Tryptophan can be also included as a remedy for a decrease in alcohol motivation.*

ЭФФЕКТЫ АМИНОКИСЛОТНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ФОНД АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ, ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СИНДРОМЕ ОТМЕНЫ ЭТАНОЛА

Разводовский Ю.Е.

*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Исследовано влияние двух комплексных аминокислотных композиций на основе аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ), таурина и триптофана на фонд свободных аминокислот плазмы, печени и головного мозга крыс при синдроме отмены этанола (СОЭ). Установлено, что СОЭ вызывает дисбаланс в фонде свободных аминокислот плазмы крови и печени, проявляющимся снижением соотношения уровней АРУЦ и ААК. СОЭ также сопровождается снижением уровня триптофана в коре, стриатуме и среднем мозге. Аминокислотные композиции АРУЦ+таурин и АРУЦ+таурин+триптофан нормализуют соотношение АРУЦ и ААК в печени и повышают это соотношение в плазме крови, что может свидетельствовать об гепатопротекторном их действии. Поскольку аминокислотная композиция, состоящая из АРУЦ и таурина снижает доступность предшественника серотонина в головном мозге при СОЭ, представляется целесообразным включение в ее состав L-триптофана.

Введение. Одной из задач современной биохимии является целенаправленная регуляция метаболических процессов биологически активными природными соединениями. В силу важности роли, которую играют аминокислоты и их производные в процессах метаболизма, эти соединения обладают специфическими фармакологическими эффектами и успешно используются с целью метаболической коррекции целого ряда патологических состояний [1, 2].

Поскольку сопутствующий хронической алкогольной интоксикации синдром отмены этанола (СОЭ) приводит к нарушению различных звеньев белкового обмена [3, 6, 13], аминокислоты и их производные могут быть использованы в качестве средств метаболической терапии данного патологического состояния [4, 7, 8, 16–18].

Конечный продукт превращений серосодержащих аминокислот таурин является высокоактивным природным соединением, обладающим антиоксидантными, мембраностабилизирующими и адаптогенными свойствами [5]. Результаты экспериментальных и клинических исследований позволяют рассматривать это соединение как эффективное средство метаболической коррекции последствий хронической алкогольной интоксикации [11, 12].

Показано, что таурин стимулирует окисление ацетальдегида, укорачивает продолжительность этанол-индуцированного сна, уменьшает проявления алкогольного стеатоза печени [6]. В эксперименте на крысах также установлено, что введение таурина корригирует нарушения в функционировании серотонинергической и дофаминергической систем, повышает отношение концентрации тормозных аминокислот-нейромедиаторов к возбуждающим в головном мозге, предотвращает развитие аминокислотного дисбаланса в плазме крови и печени [12] при синдроме отмены этанола.

Известно, что незаменимая аминокислота L-триптофан, являясь предшественником серотонина, обладает антидепрессивным действием, снижает острую токсичность этанола, укорачивает продолжительность вызванного этанолом сна [9, 10]. Поскольку при СОЭ угнетается активность центральной серотонинергической системы за счет снижения доступности триптофана в мозге [15], целесообразно использование этой аминокислоты с целью коррекции аффективных нарушений, сопутствующих этому патологическому состоянию. В экспериментальном исследовании продемонстрировано, что внутривентрикулярное введение L-триптофана на фоне СОЭ в дозах 50 и 100 мг/кг купирует нарушения функционирования серотонинергической системы [10].

В механизме антиалкогольного эффекта триптофана, кроме нормализации нарушений в центральной серотонинергической системе, также играет роль усиление синтеза никотинамидных коферментов [6]. Эти свойства триптофана делают перспективным использование его в качестве как самостоятельного антиалкогольного препарата, так и в композиции с другими аминокислотами.

Антиалкогольными эффектами обладают и другие аминокислоты [6]. Потребление на фоне хронической алкогольной интоксикации диеты, обогащенной аминокислотами с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ), частично предупреждает морфологические и ультраструктурные изменения в печени [18]. Внутривентрикулярное введение композиции, состоящей из АРУЦ и таурина, способно предотвращать развитие алкогольного стеатоза в экспериментальной модели алкоголизма по *Maichrowicz* [2].

Цель исследования — изучение влияния двух комплексных аминокислотных препаратов на основе АРУЦ, таурина и триптофана на фонд свободных аминокислот плазмы крови при субхронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы исследования. Синдром отмены этанола моделировали на 26 белых беспородных крысах-самцах массой 160–180 г. принудительной алкоголизацией по *Majchrowicz* [14]. Растворы этанола (25 об %) вводили внутривентрикулярно по 20 мл/кг на протяжении 5,5 сут с интервалом 12 ч. Композицию, состоящую из лейцина, валина, изолейцина и таурина (композиция I) в массовых соотношениях 1:0,25:0,25:0,5, вводили внутривентрикулярно в виде водного раствора через 30 мин после каждого введения этанола на протяжении последних 10 дней алкоголизации. Аналогичным образом вводили композицию лейцина, валина, изолейцина, таурина и триптофана (композиция II) в массовых соотношениях 1:0,25:0,25:0,5:0,4. Суммарная суточная доза аминокислотных композиций составляла 0,5 г/кг и 0,6 г/кг соответственно, а этанола — 7 г/кг массы животных. Контрольные животные получали внутривентрикулярно воду в эквивалентных количествах.

Спектр определяемых соединений включал протеиногенные аминокислоты, орнитин, цитруллин, а также ряд родственных соединений (таурин, α -аминобутират и этаноламин). Анализ аминокислот и их дериватов проводился на хроматографе *Agilent 1100* методом обращенно-фазной хроматографии с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой в Na-боратном буфере.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы *StatSoft Statistica 10.0*. Применялись методы описательной статистики, сравнение групповых средних производилось с помощью параметрического дисперсионного анализа после проверки на корректность его применения. В случае нарушения условий его применимости использовался непараметрический дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса. Анализ аминокислотного дисбаланса осуществлялся при помощи линейного дискриминантного анализа.

Результаты исследования и их обсуждение. Синдром отмены этанола сопровождался повышением уровней таурина, аланина, гистидина и метионина в плазме крови. Повышение уровня аланина в плазме может быть следствием усиления оборота глюкозо-аланинового цикла и активации глюконеогенеза [6].

Введение композиции АРУЦ+таурин на фоне отмены этанола приводит к увеличению концентрации таурина в плазме (как по отношению к контролю, так и по отношению к СОЭ). Кроме того, отмечался рост концентрации лейцина и снижение уровней треонина, глутамина, гидроксипролина, пролина, цистатинина, фенилаланина и лизина. Введение композиции препятствовало повышению уровня метионина, наблюдавшегося через 12 ч после отмены алкоголя, и снижению уровня цистатинина, что свидетельствует о торможении превращений серосодержащих аминокислот (транссульфурирования) [13].

Введение композиции АРУЦ+таурин+триптофан на фоне СОЭ вызвало повышение в плазме уровней таурина, валина, лейцина и снижение треонина, серина, глутамина, гидроксипролина, пролина, глицина, цистатинина, тирозина и лизина. Наряду с этим, введение этой композиции препятствовало росту уровней метионина, аланина и гистидина. Эти изменения можно объяснить, как и в случае введения композиции АРУЦ+таурин, торможением превращений серосодержащих соединений, а также снижением активности глюконеогенеза, вследствие чего происходит замедление оборачиваемости глюкозо-аланинового цикла [6]. Таким образом, введение композиции АРУЦ+таурин+триптофан на фоне СОЭ способствует обеднению аминокислотного фонда плазмы и одновременно повышению уровней аминокислот, входящих в состав композиции (таурин и АРУЦ).

В печени при СОЭ отмечалось снижение уровня таурина и рост уровня гистидина. Кроме того, СОЭ сопровождался снижением соотношения разветвленных и ароматических аминокислот, что может указывать на нарушения функции печени [1]. Введение композиции АРУЦ+таурин вызвало снижение в печени уровней глутамина и лизина по отношению к контролю, а также повышению уровня гистидина, лейцина и снижению уровня аспартата по отношению к СОЭ.

Введение композиции АРУЦ+таурин+триптофан предотвращало увеличение концентрации гистидина и повышало уровень метионина по отношению к контролю, а также повышало уровень таурина, глицина, лейцина по отношению к СОЭ. При этом концентрации остальных свободных аминокислот по отношению к контролю не изменялись. Обращает на себя внимание различный характер взаимосвязей между уровнями АРУЦ и ААК при введении исследуемых композиций. Так, при введении композиции АРУЦ+таурин+триптофан их уровни коррелировали друг с другом, что говорит об опосредованном (через общие транспортные системы) действии этой композиции на пул АРУЦ и ААК в печени. В то же время при введении композиции АРУЦ+таурин корреляции между уровнями АРУЦ и ААК не наблюдалось.

Исследуемые композиции оказывали однонаправленное действие на соотношение АРУЦ и ААК в печени и плазме. В печени это соотношение, снижавшееся при СОЭ, нормализовалось, в то время как в плазме оно повысилось более чем в 2 раза. Это может являться показателем гепатопротекторного действия исследуемых композиций [1]. Введение обоих аминокислотных препаратов повышало в плазме крови долю незаменимых аминокислот, обедняя при этом суммарный пул протеиногенных аминокислот. Такой эффект композиций может объясняться анаболическим действием входящего в их состав лейцина, результатом чего является усиление включения свободных аминокислот в белки [1]. Введение обеих исследованных аминокислотных композиций на основе АРУЦ, таурина и триптофана при СОЭ вызывает большей частью однонаправленные эффекты в отношении уровней свободных аминокислот плазмы, которые

выражаются в обеднении суммарного фонда протеиногенных аминокислот и повышении уровня АРУЦ и таурина.

Для общей характеристики изменений пула свободных аминокислот в совокупности исследованных групп был применен линейно-дискриминантный анализ. В плазме наиболее значимыми показателями по величинам F-критерия Фишера являлись фенилаланин, аланин, таурин, валин и гистидин, в печени — лизин, гистидин, фенилаланин и глутамат. Анализ расположения реализаций на плоскости двух главных компонент позволил сделать вывод о корригирующем действии обеих композиций в отношении пула свободных аминокислот и их производных в печени и плазме крови, причем композиция АРУЦ+таурин обладает более выраженным нормализующим эффектом, чем композиция АРУЦ+ таурин+триптофан.

В гипоталамусе СОЭ сопровождался снижением уровней аспарагина и треонина по отношению к контролю. Кроме того, отмечалась тенденция к снижению уровней адреналина, дофамина и таурина, а также тенденция к росту уровня гомованилиновой кислоты. Тенденция к снижению уровня адреналина может свидетельствовать об угнетении активности норадренергической системы. Тенденция к снижению уровня дофамина может быть обусловлена снижением при СОЭ активности скорости лимитирующего фермента декарбоксилазы ароматических аминокислот [1].

С другой стороны, тенденция к росту уровня гомованилиновой кислоты позволяет предположить, что при СОЭ в гипоталамусе отмечается усиление синаптического выброса и катаболизма медиатора в дофаминовой системе. Тенденция к снижению уровня тормозного медиатора/модулятора таурина согласуется с представлением об угнетении процессов торможения в головном мозге при СОЭ [11].

Введение композиции АРУЦ+таурин на фоне СОЭ сопровождается повышением уровней диоксифенилуксусной кислоты, аспартата, глутамата, аспарагина, фосфоэтаноламина и таурина, а также снижением триптофана и тирозина. Кроме того, снижается уровень тирозина, триптофана, треонина и повышается уровень ФЭА по отношению к контролю. В целом, наряду с эффектом нормализации уровня ряда показателей (аспарагин, таурин), введение композиции АРУЦ+таурин привело к существенным сдвигам в фонде центральных нейроактивных соединений. Снижение уровней триптофана и тирозина, вероятно, обусловлено снижением его доступности в мозге, поскольку в плазме крови растет уровень лейцина и валина. Известно, что АРУЦ и ароматические аминокислоты конкурируют за общие транспортные системы [20]. Конкуренцией за общие транспортные системы также можно объяснить снижение уровня тирозина при введении композиции АРУЦ+таурин.

Введение композиции АРУЦ+таурин+триптофан привело к росту уровней триптофана, аспартата, глутамата, аспарагина, таурина, а также к снижению уровней тирозина, норадреналина, гомованилиновой кислоты, гистидина и аргинина. Кроме того, по сравнению с контролем снижались уровни тирозина, гистидина, треонина и повышались уровни триптофана и фосфоэтаноламина. Снижение уровня гомованилиновой кислоты может указывать на снижение синаптического выброса и деградации дофамина очевидно за счет снижения доступности предшественника нейромедиатора.

В сравнительном аспекте направленность сдвигов в фонде аминокислот и их производных при введении композиции АРУЦ+таурин+триптофан аналогична эффектам композиции АРУЦ+таурин. Существенным отличием является значительный рост уровня триптофана при введении композиции АРУЦ+таурин+триптофан, что очевидно обусловлено ростом его уровня в плазме за счет экзогенного поступления в составе аминокислотной композиции и, как следс-

твие, улучшение его проникновения через гематоэнцефалический барьер из-за высокого градиента концентрации. Следует также отметить, что при введении композиции АРУЦ+таурин+триптофан, в отличие от введения композиции, не содержащей триптофана, отмечается более выраженное снижение уровня тирозина, сопровождающееся снижением дофаминергической активности. Данный эффект, по всей вероятности, обусловлен тем, что триптофан, входящий в состав композиции, наряду с АРУЦ, конкурирует за общие транспортные системы с тирозином.

Влияние исследуемых композиций на фонд биогенных аминов и нейроактивных аминокислот в гипоталамусе можно оценить с помощью дискриминантного анализа. Наиболее значимыми соединениями согласно значению критерия Фишера (вносящими наибольший вклад в общую дисперсию), были уровни следующих соединений: триптофан, тирозин, треонин, аспаргат, аргинин.

В коре лобной доли больших полушарий СОЭ сопровождался снижением уровней триптофана, 5-ОТ, треонина и таурина. Снижение уровня триптофана и 5-окситриптофана (5-ОТ) при СОЭ согласуется с литературными данными, которые говорят о том, что снижение доступности предшественника нейромедиатора в головном мозге может являться причиной снижения центральной серотонинергической активности при СОЭ [15]. Снижение уровня тормозного нейромедиатора таурина также согласуется с данными литературы относительно преобладания процессов возбуждения при СОЭ [11].

Введение композиции АРУЦ+таурин привело к снижению по сравнению с СОЭ уровней тирозина, триптофана, гистидина. Кроме того, отмечается снижение уровней тирозина, глутамата, аспарагина, серина, гистидина и повышение β-аланина по сравнению с контролем. Наиболее отчетливым эффектом композиции АРУЦ+таурин в коре, также как и в гипоталамусе, было снижение уровней триптофана и тирозина.

Введение композиции АРУЦ+таурин+триптофан привело к снижению уровней тирозина и гистидина, а также повышению триптофана (в 2 раза), 5-ОТ, серотонина и гомовалиновой кислоты по сравнению с СОЭ. Отмечалось также снижение уровней тирозина, аспарагина, серина и гистидина по сравнению с контролем. Необходимо подчеркнуть, что включение триптофана в состав композиции АРУЦ+таурин предотвращает снижение уровней триптофана и 5-ОТ в коре головного мозга, отмечающееся при введении данной композиции на фоне СОЭ, а также повышает уровень серотонина. Следовательно, введение композиции АРУЦ+таурин+триптофан на фоне СОЭ стимулирует серотонинергическую активность в коре головного мозга.

Наиболее значимыми показателями, согласно значению критерия Фишера, были уровни тирозина, триптофана, β-аланина, гистидина, таурина, норадреналина, диоксифенилаланина, ГАМК, диоксифенилуксусной кислоты. Проекция отдельных реализаций на плоскость двух главных компонент (корней) показала, что влияние обеих композиций на фонд исследованных соединений носит нормализующий характер, причем для композиции АРУЦ+таурин+триптофан эффект нормализации более выражен.

В стриатуме основным эффектом СОЭ было снижение уровня триптофана. Введение композиции АРУЦ+таурин сопровождалось ростом уровня дофамина и диоксифенилуксусной кислоты по сравнению с контролем. Кроме того, сохранялся сниженный на фоне СОЭ уровень триптофана.

Введение композиции АРУЦ+таурин+триптофан привело к повышению уровней триптофана (в 2 раза), 5-оксииндолилуксусной кислоты (5-ОИУК), гомованилиновой кислоты, а также к снижению уровней глутамата, треонина, 5-ОТ и аргинина. Также как и в других отделах го-

ловного мозга, наиболее отчетливым эффектом данной аминокислоты композиции является повышение уровня триптофана. Данные изменения указывают на ускорение оборота нейромедиатора в серотониновой системе, очевидно, за счет увеличения доступности предшественника. Наиболее значимыми, согласно значению критерия Фишера, были следующие соединения: гомованилиновая кислота, триптофан, диоксифенилуксусная кислота.

В среднем мозге СОЭ сопровождался снижением уровней триптофана, гомованилиновой кислоты, гистидина, глицина, треонина, а также повышением фосфоэтанолamina. Следует подчеркнуть, что снижение уровня триптофана при СОЭ отмечалось также в коре и стриатуме. По всей видимости снижение доступности предшественника серотонина в головном мозге является одним из патогенетических механизмов СОЭ.

Введение композиции АРУЦ+таурин приводило к повышению по сравнению с СОЭ уровня дофамина, а также снижению уровней тирозина, триптофана, 5-ОТ, гомованилиновой кислоты, гистидина. По сравнению с контролем повышался уровень аспарагина. Повышение дофамина и снижение уровня гомованилиновой кислоты может свидетельствовать о снижении скорости синаптической деградации медиатора в дофаминергической системе. Также как и в других отделах мозга, введение данной композиции снижало уровень триптофана и тирозина очевидно за счет конкуренции за общие транспортные пути с АРУЦ.

Введение композиции АРУЦ+таурин+триптофан привело к повышению по отношению к СОЭ уровней триптофана, 5-ОТ, β -аланина, а также к снижению уровней тирозина, аспартата, глутамата, серина, гистидина, треонина, фосфоэтанолamina. Отмечалось также снижение уровня таурина по отношению к контролю. В отличие от композиции АРУЦ+таурин данная аминокислотная композиция вызывает повышение уровня триптофана.

Наиболее значимыми соединениями согласно значению критерия Фишера были уровни следующих соединений: гистидин, триптофан, тирозин, аспарагин. Проекция отдельных реализаций на плоскость двух главных компонент показала, что влияние композиции АРУЦ+таурин+триптофан на фонд исследованных соединений носит нормализующий характер по первому корню, характеризующему 73 % полной дисперсии.

Полученные данные указывают на то, что одним из наиболее отчетливых эффектов СОЭ на фонд нейроактивных аминокислот в головном мозге является снижение уровня триптофана. Уровень этой аминокислоты в головном мозге является ключевой детерминантой скорости синтеза нейромедиатора в серотонинергической системе, поскольку при его снижении уменьшается насыщение субстратом скорость-лимитирующего фермента этого синтеза триптофангидроксилазы [15]. Доступность триптофана в мозге определяется тремя основными факторами: активностью печеночной триптофан-пирролазы, уровнем связывания триптофана с белками плазмы, а также степенью конкуренции триптофана с другими аминокислотами (валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, тирозин) за общую систему транспорта в головной мозг [15].

Снижение доступности триптофана в мозге при СОЭ может быть обусловлено снижением его уровня в плазме из-за индукции печеночной триптофан-пирролазы кортизолом [6]. Введение композиции АРУЦ+таурин приводило к еще большему, по сравнению с СОЭ снижению доступности триптофана очевидно из-за его конкуренции с АРУЦ за общие системы транспорта в головной мозг. Поэтому с целью увеличения доступности предшественника серотонина в головном мозге при СОЭ представляется целесообразным включение триптофана в аминокислотную композицию, состоящую из АРУЦ и таурина.

Таким образом, основными эффектами СОЭ являются снижение уровня триптофана (в коре, стриатуме и среднем мозге), а также тормозных нейромедиаторов (в коре и среднем мозге).

Введение композиции АРУЦ+таурин, наряду с нормализацией уровня некоторых нейроактивных соединений, сопровождается дальнейшим снижением уровня триптофана во всех исследованных отделах мозга, а также снижением уровня тирозина в гипоталамусе, коре и среднем мозге. Введение композиции АРУЦ+ таурин+триптофан привело к значительному повышению уровня триптофана во всех исследованных отделах мозга, а также к снижению уровня тирозина в гипоталамусе, коре и среднем мозге.

Заключение. На основании изложенного выше можно сделать следующие выводы:

1. Синдром отмены этанола сопровождается дисбалансом в фонде свободных аминокислот плазмы и печени, проявляющимся снижением соотношения уровней АРУЦ и ААК, что может свидетельствовать о развитии функциональных нарушений в печени. Аминокислотные композиции АРУЦ+таурин и АРУЦ+таурин+триптофан нормализуют соотношение АРУЦ и ААК в печени и повышают это соотношение в плазме крови, что может свидетельствовать об гепатопротекторном их действии. Композиция АРУЦ+таурина при введении на фоне СОЭ оказывает более выраженное нормализующее действие на фонд аминокислот печени и плазмы, чем композиция АРУЦ+таурина+триптофана.

2. Синдром отмены этанола сопровождается дисбалансом в фонде аминокислот и их производных в головном мозге, в частности, снижением доступности предшественника серотонина триптофана в коре, стриатуме и среднем мозге. Введение композиции АРУЦ+таурин приводит к дополнительному снижению уровня триптофана во всех исследованных отделах мозга. Введение композиции АРУЦ+таурин+триптофан приводит к значительному повышению уровня триптофана во всех исследованных отделах мозга, а также стимулирует серотонинергическую активность в среднем мозге, стриатуме и коре головного мозга за счет увеличения доступности предшественника.

3. Поскольку аминокислотная композиция, состоящая из АРУЦ и таурина, снижает доступность предшественника серотонина в головном мозге при СОЭ, представляется целесообразным включение в ее состав L-триптофана.

Список литературы

1. Аминокислоты и их производные в патогенезе и лечении поражений печени / Л.И. Нефёдов [и др.] // Весці АН Беларусі. Сер. хім. навук. — 1997. — № 2. — С. 39–48.
2. Гепатопротективные эффекты аминокислот при алкогольном поражении печени. / Ю.Е. Разводовский [и др.] // Актуальные вопросы гепатологии: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 27–28 сентября 2000 г. — С. 54.
3. Козловский, А.В. Нарушения обмена аминокислот при алкоголизме / А.В. Козловский, Ю.Е. Разводовский, С.Ю. Островский // Материалы научно-практической конференции, посвященной 40-летию ГрГМУ. — Гродно, 1998. — С. 37.
4. Метаболическая терапия при алкоголизме / В.В. Лелевич [и др.] // Медицинские новости. — 2001. — № 2. — С. 12–16.
5. Нефёдов, Л.И. Биологическая роль таурина (обзор). / Л.И. Нефёдов // Весці АН Беларусі: Сер. біял. навук. — 1992. — № 3–4. — С. 99–106.
6. Островский, Ю.М. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю.М. Островский, С.Ю. Островский. — Минск: Наука и техника, 1995. — 278 с.
7. Применение таурина в комплексном лечении алкоголизма / Ю.Е. Разводовский [и др.] // Актуальные вопросы современной медицины: материалы науч.-практ. конф. — Гродно, 2002. — С. 327–330.
8. Разводовский, Ю.Е. Аминокислоты в патогенезе и лечении алкоголизма / Ю.Е. Разводовский // Наркология. — 2010. — № 6. — С. 88–97.

9. Разводовский, Ю.Е. Влияние L-триптофана на продолжительность этанол-индуцированного сна / Ю.Е. Разводовский // Материалы научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященной памяти академика Ю.М. Островского. — Гродно, 2003. — С. 185.
10. Разводовский, Ю.Е. Влияние L-триптофана на фонд центральных нейроактивных соединений при синдроме отмены этанола / Ю.Е. Разводовский, Е.М. Дорошенко // Нейрохимия. — 2004. — Т. 21, № 1. — С. 44–51.
11. Разводовский, Ю.Е. Влияние таурина на содержание в ЦНС нейроактивных соединений при синдроме отмены этанола / Ю.Е. Разводовский, Е.М. Дорошенко // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2007. — Т. 70, № 5. — С. 38–43.
12. Смирнов, В.Ю. Влияние таурина на фонд свободных аминокислот при синдроме отмены этанола / В.Ю. Смирнов, Ю.Е. Разводовский, Е.М. Дорошенко // Журнал ГрГМУ. — 2004. — № 1. — С. 24–26.
13. Шейбак, В.М. Обмен свободных аминокислот и кофермента А при алкогольной интоксикации / В.М. Шейбак. — Гродно, 1998. — 152 с.
14. Majchrowicz, E. Animal models in alcohol research / W.A. E. Majchrowicz, W.A. Hunt // eds. K. Eriksson, J.D. Sinclair, K. Kiianmaa. — N.Y.:L., 1980. — P. 419–424.
15. Badawy, A.A. Tryptophan metabolism in alcoholism / A.A. Badawy // J. Adv. Exp. Med. Biol. — 1999. — Vol. 467. — P. 265–272.
16. Howland, R.H. Dietary supplement drug therapies for depression / R.H. Howland // J Psychosoc Nurs Ment Health Serv. — 2012. — Vol. 50, № 6. — P. 13–16.
17. The use of a food supplementation with D-phenylalanine, L-glutamine and L-5-hydroxytryptophan in the alleviation of alcohol withdrawal symptoms / T. Jukić [et al.] // Coll Antropol. — 2011. — Vol. 35, № 4. — P. 1225–1230.
18. Effect of parenteral amino acid supplementation on short-term and long-term outcomes in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled trial / E. Mezey [et al.] // J. Hepatology. — 1991. — Vol. 14, № 6. — P. 1090–1096.

EFFECTS OF AMINO ACIDS COMPOSITION ON THE POOL OF BLOOD PLASMA, LIVER AND BRAIN AMINO ACIDS IN THE ALCOHOL WITHDRAWAL SYNDROME

Razvodovsky Y.E.

*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The effects of complex compositions containing branched-chain amino acids (BCAA), taurine and tryptophan on the pool of free amino acids in the plasma, liver and brain of rats were studied under conditions of the alcohol withdrawal syndrome (AWS). It was established that AWS led to an imbalance in the pool of blood plasma free amino acids, which manifests itself by a decrease in the ratio of BCAA and aromatic amino acids. The administration of the composition of BCAA+taurine and BCAA+taurine+tryptophan was found to normalize the ratio of BCAA and aromatic amino acids in the liver and increase this ratio in the plasma. Since the composition of BCAA+taurine decreased the availability of the serotonin precursor in the brain under conditions of AWS, it would be useful to incorporate it into the composition of L- tryptophan.*

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ПОХМЕЛЬНОГО СИНДРОМА

Разводовский Ю.Е., Шляхтун А.Г., Семененя И.Н.

*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. Целью настоящей работы было изучение текущего состояния проблемы метаболической терапии похмельного синдрома (ПС). Проведен обзор отечественных и зарубежных литературных источников, посвященных ПС. Показано существование значительных пробелов в понимании патогенеза ПС, что затрудняет разработку средств метаболической коррекции этого состояния. Мишенью большинства из предлагаемых в настоящее время средств лечения ПС является какой-нибудь один из патогенетических механизмов ПС. Эффективность большинства из имеющихся препаратов не подтверждена результатами клинических исследований. Актуальной задачей дальнейших исследований является детальное изучение патогенетических механизмов ПС, что позволит разработать комплексное средство лечения ПС, воздействующее на все звенья его патогенеза.

Злоупотребление алкоголем наносит значительный ущерб здоровью и ассоциируется с более чем с двумя сотнями различных заболеваний [1]. Одним из наиболее частых негативных последствий злоупотребления алкоголем является так называемый постинтоксикационный, или похмельный синдром (ПС), который представляет собой симптомокомплекс психофизиологических нарушений, развивающихся на следующее утро после алкогольного эксцесса (употребления алкоголя в большой дозе) накануне вечером [2, 5, 6, 14, 19]. Клиническая симптоматика ПС достаточно сильно варьирует. В классическом виде ПС манифестирует констелляцией соматических (общее недомогание, головокружение, головная боль, утомляемость, тошнота, сухость во рту, жажда, отсутствие аппетита) и психических (пониженное настроение, нарушение концентрации внимания, когнитивный дефицит) симптомов [17, 19].

В экспериментальных исследованиях было показано, что в состоянии ПС увеличивается время реакции и число ошибок при выполнении задания [5, 6]. Нарушение когнитивных функций (внимания, оперативной, ретроспективной и проспективной памяти, дефицит исполнительской функции) и психомоторные нарушения, отмечающиеся при ПС, приводят к снижению продуктивности труда, повышают риск производственного и дорожно-транспортного травматизма [14].

Несмотря на значительный ущерб здоровью и большие экономические потери, ассоциирующиеся с ПС, патогенез данного состояния изучен недостаточно. Вместе с тем понимание патогенетических механизмов ПС необходимо для разработки средств профилактики и лечения этого состояния. Предположительными механизмами патогенеза ПС являются индуцированные алкоголем метаболические и эндокринные нарушения, оксидативный стресс, воспаление, дегидратация (алкоголь повышает диурез), нарушение минерального обмена (снижение уровня кальция и магния в плазме крови), алкогольный лактат- и кетоацидоз (вследствие усиление образования ацетоацетата и бета-оксимасляной кислоты) [3, 15, 16].

Тяжесть ПС зависит от целого ряда факторов, одним из которых является доза принятого накануне вечером алкоголя [6]. При этом следует отметить, что ПС развивается на фоне отсутствия алкоголя в крови [16]. Одним из факторов, влияющих на тяжесть ПС, является скорость метаболизма этанола. Было установлено, что у лиц с медленным метаболизмом этанола и, соответственно, с высоким уровнем алкоголя в моче, ПС более выражен, чем у лиц с быстрым метаболизмом этанола [3]. Алкоголь обладает гипогликемическим эффектом [1], что может обуславливать появление таких симптомов ПС, как утомляемость, нарушение внимания, головная боль.

Изменение в составе кишечной микрофлоры может играть важную роль в патогенезе похмельного синдрома [6]. Индуцированный алкоголем дисбактериоз характеризуется повышением количества провоспалительных и снижением количества противовоспалительных цитокинов [3]. Кроме того, алкоголь, повреждая кишечную стенку, увеличивает проницаемость кишечного барьера, что приводит к усилению всасывания токсичных продуктов [2]. Сочетанным эффектом дисбактериоза и повреждения кишечного барьера является эндотоксемия и повышение уровня провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 [3]. Предполагается, что провоспалительные цитокины кишечного происхождения вызывают воспаление в головном мозге, чем и объясняется симптоматика похмельного синдрома со стороны центральной нервной системы [16]. Недостаточное понимание патогенетических механизмов ПС затрудняет разработку научно обоснованных эффективных средств его профилактики и лечения. Тем не менее в настоящее время во многих странах мира ведется активная работа в данном направлении.

Наиболее перспективным подходом к разработке способов профилактики и купирования ПС является использование средств, которые ускоряют метаболизм этанола. Быстрая элиминация этанола и ацетальдегида из организма может снизить тяжесть похмельного синдрома [9].

Важным направлением исследований является изучение влияния различных нутриентов на тяжесть ПС. Известно, что прием пищи (особенно жирной) накануне либо во время употребления алкоголя замедляет его абсорбцию и снижает пиковую концентрацию в крови, тем самым ослабляя проявление симптоматики ПС [8]. Некоторые витамины (никотиновая кислота, витамины группы В, витамин С) и микроэлементы (селен, цинк, медь, магний, железо, ванадий), оказывая прямое влияние на метаболизм алкоголя либо посредством своих антиоксидантных и противовоспалительных свойств, могут влиять на вероятность появления и выраженность проявлений ПС [12, 18]. В частности, никотиновая кислота (витамин РР) в организме превращается в никотинамид, который входит в состав НАД и НАДФ, участвующих в метаболизме этанола [18]. В исследовании на добровольцах, не страдающих алкогольной зависимостью, было показано, что употребление никотиновой кислоты в составе диеты негативно ассоциируется с выраженностью клинической симптоматики ПС [12].

Что касается других витаминов, то данные относительно их использования с целью купирования проявлений ПС достаточно противоречивы. К примеру, Kahn с соавторами установил, что использование витамина В₆ *per os* значительно снижает выраженность симптоматики ПС [9]. В то же время Kelly с соавторами показал, что внутривенное введение комплекса витаминов группы В и витамина С не оказывает влияния на метаболизм этанола [10]. Laas провел двойное слепое, плацебо контролируемое исследование, с целью изучения эффективности средства от похмелья Morning Fit, в состав которого входят сухие дрожжи, а также витамины В₁, В₂ и В₆ [11]. Было установлено, что данное средство не снижает уровень алкоголя и ацетальдегида в крови и не оказывает влияния на выраженность симптоматики ПС [11]. Литературные данные относительно использования микроэлементов с целью купирования ПС ограничены. В одном

из немногих исследований, посвященных данной проблеме, было показано, что использование цинка в составе диеты снижает выраженность симптоматики ПС [13].

Учитывая повышение уровня провоспалительных цитокинов после употребления алкоголя в большой дозе [2], потенциально перспективным способом купирования ПС является использование средств, снижающих их уровень. Пробиотики нормализуют микрофлору кишечника, снижают проницаемость кишечной стенки и уменьшают продукцию провоспалительных цитокинов [13]. Установлено, что пробиотики снижают выраженность воспаления в нервной ткани, вызванного индуцированной алкоголем эндотоксемией [1]. Было показано, что после 3-месячного курса лечения пробиотиками у лиц, злоупотребляющих алкоголем, отмечалось снижение уровня провоспалительных цитокинов в крови, а также практически полностью исчезали симптомы похмелья [18].

В США было проведено пилотное клиническое испытание средства от похмелья JMI-001, представляющего собой комбинацию нестероидного противовоспалительного средства и антагониста H_1 -рецепторов [8]. Показано, что прием данного средства накануне употребления алкоголя значительно снижает тяжесть ПС. В одном из исследований было установлено, что внутривенное введение пептидного гормона грелина, продуцируемого клетками слизистой оболочки желудка, значительно снижает тяжесть ПС [18].

В литературе имеются сведения об эффективности использования растительных экстрактов с целью купирования ПС. В частности Bang с соавторами показал, что экстракт *Acanthopanax senticosus* нормализует уровень глюкозы, снижает уровень С-реактивного белка, а также снижает выраженность таких симптомов ПС, как усталость, головокружение, головная боль [7]. Kim с соавторами установил, что экстракт из плодов *Hovenia dulcis*, содержащий гетерополисахариды и дигидромирицитин, значительно снижает уровень провоспалительных цитокинов в плазме крови и уменьшает выраженность симптомов похмелья [4]. В двойном слепом плацебо контролируемом исследовании было продемонстрировано, что экстракт *Opuntia ficus indica* снижает уровень С-реактивного белка, увеличивает синтез белков теплового шока, наполовину снижает вероятность развития тяжелого ПС, а также значительно снижает выраженность симптоматики ПС [18]. В другом исследовании было показано, что смесь полифенолов из *Viscum album*, *Lycium chinense*, *Inonotus obliquus* и *Acanthopanax senticosus* значительно снижает содержание алкоголя в крови через два часа после употребления алкоголя [8].

В заключение следует упомянуть о существовании целого ряда антипохмельных средств, которые представлены на отечественном фармацевтическом рынке (Алекол, Глутаргин Алколин, Алкофф, Алкофри, Айбимед Алкомед, Алкозелцер). Активными ингредиентами этих препаратов являются янтарная кислота, липоевая кислота, глутаминовая кислота, аргинина глутамат, глицин, фенилаланин, никотинамид, N-ацетил-L-цистеин, селен. Некоторые из упомянутых антипохмельных средств пользуются коммерческим успехом, несмотря на отсутствие доказательной базы их эффективности.

Таким образом, тяжелое бремя медико-социальных проблем и экономического ущерба, связанное с ПС, обуславливает необходимость разработки мер профилактики и лечения этого патологического состояния. Обзор литературных данных показал существование значительных пробелов в понимании патогенеза ПС, что затрудняет разработку средств метаболической коррекции этого состояния. Мишенью большинства из предлагаемых в настоящее время средств лечения ПС является какой-нибудь один из патогенетических механизмов ПС. Эффективность большинства из имеющихся препаратов не подтверждена результатами клинических исследований. Кроме того, многие из них обладают побочными эффектами, что ограничивает их использование. Таким образом, актуальной задачей дальнейших исследований является детальное

изучение патогенетических механизмов ПС, что позволит разработать комплексное средство лечения ПС, воздействующее на все звенья его патогенеза. Самостоятельным направлением исследований может быть разработка средств профилактики ПС. При этом следует понимать, что лучшим средством профилактики ПС является отказ от употребления алкоголя.

Список литературы

1. Разводовский, Ю.Е. Алкоголизм: медицинские и социальные аспекты. — Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing Gmb & Co. KG, 2012. — 294 с.
2. Разводовский, Ю.Е. Наркология — Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2013. — 137 с.
3. A Review of the Physiological Factors Associated with Alcohol Hangover / C.T Tipple [et al.] // *Current Drug Abuse Review*. — 2016. — Vol. 9, № 2. — P. 93–98.
4. A standardized extract of the fruit of *Hovenia dulcis* alleviated alcohol-induced hangover in healthy subjects with heterozygous ALDH2: A randomized, controlled, crossover trial / H. Kim // *Journal Ethnopharmacol.* — 2017. — № 209. — P. 167–174.
5. Alcohol hangover and managerial effectiveness / S. Streufert // *J. Alc. Clin. Exp. Res.* — 1995. — Vol. 19. — P. 1141–1146.
6. Becker, J. The alcohol hangover / J. Becker // *Ann Intern Med.* — 2001. — № 134. — P. 533–534.
7. Clinical effect of a polysaccharide-rich extract of *Acanthopanax senticosus* on alcohol hangover / J.S. Bang [et al.] // *J. Pharmazie.* — 2015. — № 70. — P. 269–273.
8. Dietary Nutrient Intake, Alcohol Metabolism, and Hangover Severity / J.C. Verster [et al.] // *J. Clinical Medicine.* — 2019. — № 8. — P. 34–42.
9. Kahn, M.A. Alcohol-induced hangover. A double-blind comparison of pyritinol and placebo in preventing hangover symptoms / M.A. Kahn, K. Jensen, H.J. Krogh // *Quartal J. Study Alcohol.* — 1973. — Vol. 34. — P. 1195–1201.
10. Kelly, M. Intravenous vitamins in acute intoxication: Effects on physiological and psychological functions / M. Kelly, A.L. Myrsten, L. Goldberg // *British J. Addiction.* — 1971. — Vol. 66. — P. 19–30.
11. Laas, I.A. double-blind placebo-controlled study on the effects of Morning Fit on hangover symptoms after a high level of alcohol consumption in healthy volunteers / I.A. Laas // *J. Clinical Research.* — 1999. — № 2. — P. 9–15.
12. Natural Products for the Prevention and Treatment of Hangover and Alcohol Use Disorder / F. Wang [et al.] // *Molecules.* — 2016. — № 21. — P. 64.
13. Pittler, M.H. Interventions for preventing or treating alcohol hangover: Systematic review of randomized controlled trials / M.H. Pittler, J.C. Verster, E. Ernst // *BMG.* — 2005. — Vol. 331. — P. 1515–1518.
14. Prat, G. Hangover: a critical review of explanatory factors / G. Prat., A Adan, M. Sónchez-Turet // *J. Human Psychopharmacology.* — 2009. — Vol. 24, № 4. — P. 259–267.
15. Swift, S. Alcohol hangover: mechanisms and mediators / S. Swift, D. Davidson // *Alcohol Health & Research World.* — 1998. — Vol. 22, № 1. — P. 54–60.
16. The pathology of alcohol hangover / R. Penning [et al.] // *Current Drug Abuse Review.* — 2010. — № 3. — P. 68–75.
17. Van Schroyen Lantman, M. Development of a definition for the alcohol hangover: Consumer descriptions and expert consensus / M. Van Schroyen Lantman, A.J. van de Loo, M. Mackus, J.C. Verster // *Current Drug Abuse Review.* — 2016. — № 9. — P. 148–154.
18. Verster, J.C. Treatment and prevention of alcohol hangover / J.C. Verster, R. Penning // *Current Drug Abuse Review.* — 2010. — № 3. — P. 103–109.
19. Wiese, J.G. The alcohol hangover / J.G. Wiese, M.G. Shlipak, W.S. Browner // *Ann Intern Med.* — 2000. — № 132. — P. 897–902.

METABOLIC TRREATMENT OF THE HANGOVER SYNDROME

Razvodovsky Y.E., Shlyachtun A.H., Semeneya I.N.

*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The aim of this study was to investigate the state of art of metabolic treatment of the hangover syndrome (HS). The review of the Russian and English language literature related to this problem was conducted. It was shown, that there was a significant gap in the understanding of the pathogenesis of HS, which hampers the elaboration of means of metabolic correction of this condition. The target of the majority of currently existing means of treatment of HS is one of the pathogenic mechanisms of HS. The effectiveness of the majority of currently existing medicine is not supported by the results of clinical trials. The actual task of future research is a detailed investigation of the pathogenic mechanisms of HS. This will allow elaborating comprehensive medicine for HS treatment targeting all links of its pathogenesis.*

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА

Семененя И.Н.

*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. В статье представлены важнейшие сведения о продуктах пчеловодства (пчелиный яд, мед, маточное молочко, пыльца, перга, прополис, воск, пчелиный подмор, трутневый гомогенат), биологически активных веществах, в них содержащихся, влиянии продуктов пчеловодства, отдельных соединений и комплексных препаратов, выделенных из них, на биохимические реакции, физиологические и патологические процессы в организме, течение болезней. Показан огромный потенциал продуктов пчеловодства для решения задач сохранения и укрепления здоровья человека, продемонстрирована их безопасность и эффективность, а также необходимость дальнейшего развития исследований в этом направлении.

Известно, что современная медицина остро нуждается в эффективных, безопасных и малозатратных способах и средствах сохранения и укрепления здоровья человека, предупреждения и избавления от различных заболеваний. К такой категории средств можно отнести продукты пчеловодства, являющиеся прекрасными целебными творениями природы и эффективными инструментами апимедицины.

Уникальность продуктов пчеловодства заключается в том, что они в силу исключительности своего богатого природного химического состава обладают очень широким спектром влияния на молекулярно-генетические, биохимические, биофизические и физиологические процессы в организме, интегральным результатом которых является укрепление здоровья, профилактика различных заболеваний и содействие избавлению от них. Они являются эффективными, безопасными и малозатратными лечебно-профилактическими средствами природного происхождения. Сейчас в мире производится более 400 наименований лечебно-профилактических средств на основе биологически активных веществ продуктов пчеловодства.

Продукты пчеловодства использовались с лечебно-профилактической целью еще задолго до нашей эры. Понимание особого значения продуктов пчеловодства в жизни человека присутствовало на протяжении всей истории человечества, в том числе и у высших руководителей государств. Так, например, на заре советской власти 11 апреля 1919 г. В.И. Лениным был подписан декрет «Об охране пчеловодства и освобождении пчеловодов от налога с целью расширения этой важной отрасли сельского хозяйства» [2].

20 ноября 2018 г. Европейский парламент принял резолюцию о защите пчел и пчеловодства в странах — членах Европейского союза, а генеральная ассамблея ООН приняла решение объявить 20 мая Всемирным днем пчел. Это связано с тем, что в последнее время на планете стали отмечаться случаи массовой гибели пчел, в результате чего сокращается производство меда и других продуктов пчеловодства, а также возникают проблемы с опылением важнейших сельскохозяйственных культур. Подсчитано, что исчезновение медоносных пчел нанесет по-

требителям во всем мире ущерб до 350 млрд евро и привести к исчезновению 20 тыс. цветковых растений, что может оказать негативное влияние на продовольственную безопасность человека. В резолюции, в частности, рекомендовано расширить научные исследования, касающиеся болезней и паразитов пчел и других факторов, вызывающих гибель пчел, провести исследования на предмет наличия связи между массовой гибелью пчел и применением пестицидов. Кроме того, важно отметить, что нектар и пыльца генномодифицированных растений резко снижает резистентность пчел ко всем неблагоприятным факторам внешней среды. В мире сейчас создано и используется свыше 25 тыс. видов трансгенных растений [6, 19].

К настоящему времени хорошо известно, что продукты пчеловодства обладают радиозащитным, иммуностимулирующим, противoinфекционным, противовоспалительным, противоаллергическим, противоопухолевым, болеутоляющим, седативным, снотворным, отхаркивающим действием, способствуют снижению артериального давления, тормозят тромбообразование, усиливают обезвреживающую функцию печени, стимулируют процессы заживления ран, эрозий и язв, расширяют коронарные сосуды, снижают содержание холестерина в крови, используются для снятия похмельного синдрома, лечения некоторых форм импотенции и т. д. [1–3, 6, 8, 9, 14, 18].

Закономерно возникает вопрос: если продукты пчеловодства обладают таким широким спектром целебного действия и практически отсутствием побочных эффектов, почему они не находят столь же широкого применения? В первую очередь это связано со слабым развитием отрасли пчеловодства, отсутствием соответствующей индустрии, недостаточной осведомленностью врачей и населения о целебных свойствах продуктов пчеловодства, отношением к меду как к пищевому продукту, крайне слабым развитием в нашей стране научных исследований в этом направлении и его популяризации. Существенным, конечно, является и то, что классические лекарства в острых случаях оказывают более быстрое и эффективное действие, чем продукты пчеловодства, для которых, как правило, характерно более мягкое действие и позднее развитие эффекта. Незначителен, по-видимому, и коммерческий интерес к продуктам пчеловодства как к лекарствам в связи с их невысокой рентабельностью по сравнению с классическим фармацевтическим бизнесом. Но сиюминутная выгода, как показывает общечеловеческая практика, нередко оборачивается большими проблемами. Сохраняется надежда на то, что мышление человека, связанное с изысканием, производством и распространением лекарств, со временем приобретет более рациональные, гуманистические черты и природную направленность, в том числе в отношении продуктов пчеловодства.

В природе неизвестны другие естественные природные химические комплексы, которые обладали бы таким многосторонним оздоравливающим влиянием на организм. Складывается впечатление, что уникальность продуктов пчеловодства связана с уникальностью их производителей — пчел. Считается, что принципы их социальной микроорганизации являются моделью, пожалуй, самой гармоничной системы сообщества живых существ в природе. Кроме того, у них, например, не отмечено развитие опухолевых заболеваний в отличие от других насекомых — мух, тараканов, бабочек и др.

До сих пор в среде специалистов, изучающих и использующих продукты пчеловодства с целью сохранения и укрепления здоровья, использовался общий термин «апитерапия». Если более системно и дифференцированно взглянуть на использование продуктов пчеловодства как средств апимедицины, то можно выделить и другие ее разделы, а именно — апипрофилактику, апиреабилитацию и апидиагностику. Можно предложить им следующие определения.

Апипрофилактика — предупреждение возникновения заболеваний или их рецидивов на основе использования технологий пчелужаления и применения продуктов пчеловодства.

Апитерапия — применение технологий пчелоужаления и продуктов пчеловодства для лечения пациентов с различными заболеваниями.

Апиреабилитация — использование технологий пчелоужаления и продуктов пчеловодства с целью восстановления нарушенных функций организма после перенесенных заболеваний, в том числе при устойчивом их снижении (ограничении) у инвалидов.

Нам представляется также возможным развитие и такого направления в апимедицине как *апидиагностика*, т. е. выявление различных функциональных расстройств организма и органических заболеваний на основе изучения (тестирования) особенностей ответных физиологических, биофизических и биохимических реакций организма на предъявляемые апитимулы, т. е. воздействие продуктами пчеловодства, прежде всего апитоксином (пчелиным ядом), на сенсорные системы организма.

Основные свойства продуктов пчеловодства

Пчелиный яд (апитоксин) является наиболее действенным средством среди продуктов пчеловодства. Он образуется специальными железами медоносных рабочих пчел, являющихся гомологами придаточных желез женского полового аппарата. Только что родившиеся пчелы яда не имеют. Пчелиный яд представляет собой густую, прозрачную, слегка желтоватую жидкость с резким специфическим запахом и жгучим, горьким вкусом. В его состав входит большое количество различных белков и пептидов (полипептидов), обладающих многообразным действием на организм, аминокислот, витаминов, микроэлементов и др. Наиболее важными ферментативными белками апитоксина являются фосфолипаза А₂ и В, гиалуронидаза, кислая фосфатаза, α-глюкозидаза, фосфомоноэстераза, β-галактозидаза. Среди полипептидов пчелиного яда, вызывающих значительные изменения в течении биохимических реакций и физиологических процессов в организме и приводящих к существенным позитивным изменениям в течении болезней, выделяются мелиттин, апамин, тертиамин, секапин и др. Среди весьма активных биогенных аминов в пчелином яде присутствуют гистамин, дофамин, норадреналин и др. Максимальное количество апитоксина накапливается в организме 17–18-дневных пчел (0,2–0,3 мг). В то же время максимальное количество наиболее действенных веществ, например, мелиттина, накапливается на 10-й день, а гистамина — на 35–40 дни. Мелиттин, например, тормозит продукцию провоспалительных цитокинов (IL-6 и TNF-α), оказывает цитотоксическое действие на клетки рака яичников человека [7, 10, 15].

Действие апитоксина на организм после пчелоужаления затрагивает практически все органы и ткани. Действует он как рефлекторно через нервную систему, так и прямо на клетки за счет всасывания своих компонентов из места попадания в организм и распространения через внутреннюю среду организма (кровь, лимфу, тканевую жидкость, ликвор). Укус пчелы вызывает покраснение и отек, которые проходят обычно через 2–3 дня. При лечебном использовании пчелиных укусов жало не вынимают в течение часа (пчела при этом погибает) [1, 7].

Не могу не отметить, что мой дядя, Савчиц Георгий Андреевич, профессиональный брестский пчеловод, всю жизнь (а прожил он 95 лет) занимался пчелами. Его отличало отменное здоровье. Он рассказывал, что за день работы с пчелами получал, бывало, до 50 ужаливаний без каких-либо токсических проявлений.

Основные эффекты пчелиного яда [1–3, 6, 7, 10]:

- расширение сосудов и увеличение кровотока, в том числе в головном мозге;
- снижение артериального давления;
- уменьшение вязкости и свертываемости крови;
- увеличение диуреза;

- уменьшение содержания холестерина в крови;
- снижение повышенного уровня глюкозы в крови;
- увеличение количества гемоглобина и эритроцитов в крови;
- стимуляция выброса гормонов надпочечников;
- расширение бронхов и увеличение отделения мокроты;
- противовоспалительное и противоаллергическое действие;
- противоотечное действие;
- стимуляция иммунитета;
- антиинфекционное действие;
- спазмолитическое действие;
- антиаритмическое действие;
- противосудорожное действие;
- уменьшение или купирование болевого синдрома;
- усиление перистальтики желудка и кишечника, стимуляция выработки пищеварительных соков;
- уменьшение алкогольной и никотиновой зависимости;
- радиозащитное действие;
- повышение аппетита;
- улучшение сна;
- улучшение памяти и настроения;
- повышение общего жизненного тонуса и работоспособности.

Показания к применению пчелиного яда:

– *заболевания нервной системы* — радикулиты, невриты, полиневриты, плекситы, невралгии, мигрень, паркинсонизм, демиелинизирующие заболевания (рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз и др.), детский церебральный паралич, эпилепсия, последствия травматических повреждений нервной системы, полиомиелита, энцефалитов, менингитов, инсультов, энурез и др.;

– *психические расстройства* — алкоголизм, наркомания, токсикомания, табакокурение, депрессивные состояния, фобии, психические расстройства при атеросклерозе сосудов головного мозга, анорексия, психосоматические расстройства и др.;

– *сердечно-сосудистые заболевания* — ишемическая болезнь сердца, аритмии, артериальная гипертония, артериальная гипотония, миокардиты, эндокардиты, перикардиты, осложнения варикозного расширения вен нижних конечностей (тромбозы, тромбофлебиты), облитерирующие заболевания сосудов (облитерирующий эндартериит, облитерирующий атеросклероз, облитерирующий тромбангиит) и др.;

– *заболевания дыхательной системы* — бронхиальная астма, хроническая пневмония, хронический бронхит, пневмосклероз, последствия плеврита и др.;

– *заболевания желудочно-кишечного тракта* — язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки вне обострения, гастриты, колиты, холециститы, желчнокаменная болезнь, гепатиты, фиброз и цирроз печени, геморрой и др.;

– *болезни крови* — анемии, лучевая болезнь, угнетение кроветворения после лучевой терапии, некоторые иммунодепрессивные состояния и др.;

– *заболевания опорно-двигательного аппарата* — артриты, полиартриты, спондилоартриты, деформирующий остеоартроз, остеохондрозы, миозиты, миопатии, контрактуры мышц и др.;

– *заболевания и повреждения кожи* — хронические язвы, раны, пролежни, рубцы различного происхождения, аллергические заболевания, псориаз, кожные проявления различных соматических заболеваний и др.;

– *инфекционные заболевания* — восстановительный период после перенесенных острых инфекций и др.;

– *аутоиммунные заболевания* — системная красная волчанка, ревматизм, ревматоидный артрит, дерматомиозит, склеродермия и др.;

– *эндокринные заболевания и болезни обмена веществ* — сахарный диабет, тиреотоксикоз, ожирение, метаболический синдром, подагра и др.;

– *глазные болезни* — конъюнктивиты, иридоциклиты, кератиты и др.;

– *урологические заболевания* — мочекаменная болезнь, простатит, некоторые формы импотенции, аденома простаты и др.;

– *гинекологические болезни* — патологический климакс, некоторые формы бесплодия и нарушения менструального цикла, хронический аднексит и др.

Кроме введения в организм путем пчелоужаления, пчелиный яд используется внутрь в таблетках, инъекциях, втираниях, ингаляциях, путем электро- и фонофореза и др.

Мед — сахаристый продукт (сладкий продукт растительно-животного происхождения), вырабатываемый медоносными пчелами путем частичного переваривания в зобе нектара растений с помощью ферментов слюны и окончательным созреванием меда в ячейках сотов (основа процесса — расщепление сахарозы до фруктозы и глюкозы) или получаемый искусственно. Выделяют *натуральный мед* (*цветочный* — вырабатывается пчелами из нектара цветов медоносных растений; *падевый* — из пади (сахаристых выделений) тлей, листоблошек, других насекомых, питающихся соками растений, и капелек медвяной росы, выступающих на листьях дуба, клена, тополя, березы, каштана, кедра и других после жаркого дня. Падевый мед содержит повышенное количество минеральных веществ, поэтому его не оставляют для зимовки пчел: повышенное количество непереваримых веществ ведет к расстройствам пищеварения у пчел, вплоть до гибели семей) и *ненатуральный*: переработанный пчелами сахарный сироп, включая *медицинский мед* (экспрессный; вырабатывается пчелами из сахарного сиропа с добавками лекарств — антибиотиков, гормонов, витаминов, жаропонижающих средств и др.), а также *искусственный* (изготавливается без участия пчел путем инвертирования сахарозы, например, соляной кислотой, или выпаривания соков арбуза, винограда, дыни и др.). Натуральный мед бывает монофлерный (в основном из нектара цветков одного растения — гречишный, клеверный, вересковый, рапсовый, липовый, ивовый, малиновый, крушиновый и др.), чаще — полифлерный (из нектара нескольких растений — лесной, полевой, луговой, горный, степной, таежный и др.).

Зрелый натуральный мед — густая, прозрачная, окрашенная (от светло-желтого до бурого цвета за счет каротиноидов, флавоноидов, хлорофилла, железа, меди, марганца и других веществ; падевый мед более темный), сладкая (каштановый, ивовый и табачный мед имеют горьковатый вкус; вересковый — терпкий привкус), ароматная жидкость (аромат меда связан с присутствием в нем более 100 веществ; падевый мед менее ароматен). При хранении он густеет, мутнеет, превращается в плотную массу (кристаллизация глюкозы). Мед почти полностью состоит из нектара растений и только некоторые компоненты попадают в мед из организма пчелы. В натуральном меде содержится более 300 веществ: ~ 75% — углеводы (основные — фруктоза 39–40 %, глюкоза 25–37 %, а также сахароза 1,3–5 %, мальтоза 5–10 %, декстрины 3–4 %, мелицитоза и др.), 13–20 % — вода, 0,3 % — белок, 5 % — аминокислоты (до 20 ами-

нокислот), ферменты (диастаза, инвертаза, глюкозооксидаза, каталаза, липаза и др.), витамины (В₁, В₂, В₆, В₉, В₁₅, РР, С, Н, К, А, Д, Е и др.), органические кислоты (яблочная, винная, лимонная, молочная, щавелевая, янтарная и др.), эфирные масла, терпеноиды, гормоны (фитогормоны и гормоны пчел), липиды, минеральные (свыше 40 макро- и микроэлементов: калий, кальций, натрий, магний, железо, йод, марганец, цинк, фосфор, сера и др.), антибиотические вещества, в частности метилглиоксаль, фенольные соединения и др.

Химический состав меда зависит от вида растения, с которого собран нектар, почвенных и климатических условий. Выше ценятся светлые сорта меда: акациевый, липовый и др. Темные сорта (гречишный и др.) более богаты минеральными веществами. Мед используется как пищевой продукт (легко усваивается в пищеварительном тракте), широко применяется в кулинарии (медовые вина, бальзамы, пиво, сбитни, пряники, коврижки, печенье, карамели и др.), косметике (медовые маски) и как лечебно-профилактическое средство [20].

Мед оказывает антибактериальное, антигрибковое, радиозащитное, иммуностимулирующее, отхаркивающее, противовоспалительное, противоаллергическое, антитромботическое, гипохолестеролемическое, гипотензивное, болеутоляющее, снотворное действие, повышает резистентность организма к действию различных повреждающих факторов, уменьшает чувство усталости, стимулирует заживление ран и язв, расширяет коронарные сосуды, усиливает обезвреживающую функцию печени и др. Используется при кожных, желудочно-кишечных, сердечно-сосудистых, бронхо-легочных, стоматологических, оториноларингологических, неврологических, ортопедо-травматологических, хирургических, урологических, гинекологических, офтальмологических, инфекционных, детских и других болезнях, а также оказывает хороший эффект при когнитивных расстройствах. Мед — прекрасная профилактика кариеса, стоматитов и гингивитов [1–3, 6, 13].

Мед применяется внутрь (1–2 г на 1 кг массы тела в сутки за 1,5–2 ч до еды или через 3 ч после еды), наружно в виде аппликаций, мазей, компрессов, электрофореза, в виде аэрозолей для ингаляций, в прямую кишку и влагалище в виде клизм, суппозиторияев, в виде местных и общих ванн и т. д. При диетическом питании рекомендуется употреблять до 100–150 г натурального меда в сутки (100 г меда ~ 335 ккал). При нагревании меда свыше 60 °С ферменты инактивируются и он лишается многих целебных свойств. При длительном хранении мед засахаривается, что не влияет на его пищевую и лечебную ценность. При торговой оценке меда главное внимание уделяется его ботаническому происхождению, зрелости (зрелый мед наvertsывается на ложку, незрелый — стекает) и водности (при содержании более 20 % воды мед закисает). Иногда встречается аллергия к меду, возможны отравления ядовитым («пьяным») медом (содержит ядовитый для человека алкалоид андромедотоксин), собранным с рододендрона желтого, аконита, багульника и других растений, произрастающих в Грузии, Средней Азии, на Дальнем Востоке [8, 9].

Мед является символом бессмертия, здоровья, благополучия, красоты, счастья и «сладости» жизни. Его называют пищей богов и эликсиром жизни. Человечество себе даже представить не может, каких успехов в сохранении и укреплении здоровья можно было бы достигнуть, каких тяжелых заболеваний можно было бы избежать, если бы медом и медопродуктами были бы заменены в питании человека, прежде всего детей, сахар, конфеты и другие кондитерские сладости на основе сахарозы.

Производство меда в мире в 2017 г. достигло 1,861 млн тонн. К сожалению, в 2018–2019 гг. на планете произошла массовая гибель пчел, приведшая к снижению производства меда. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), в 2017 г. первое место

по объемам производства меда занимал Китай (551 тыс. тонн), второе — Турция (114 тыс. тонн), третье — Аргентина (76 тыс. тонн), четвертое — Иран (70 тыс. тонн), пятое — США (67 тыс. тонн). Шестое место разделили Россия и Украина — по 66 тыс. тонн. 27 стран Европейского союза произвели в 2017 г. 230 тыс. тонн меда.

Пыльца и перга. Одним из очень питательных продуктов пчеловодства является пыльца, которую пчелы собирают с цветочных растений. Однако пыльца, которую пчелы приносят в улей, отличается от собираемой ими цветочной пыльцы. Попав на тело пчелы, цветочная пыльца уже именуется пчелиной пыльцой или обножкой, так как она существенно отличается от цветочной — на теле пчелы цветочная пыльца обрабатывается секретом челюстных желез пчелы и нектаром. Наибольшее количество пыльцы пчелы собирают в апреле-июне, в период цветения основных пыльценосов. За 1 полет пчела может принести до 40 мг пыльцы, а за день пчелиная семья — до 1 кг, за сезон — 50 кг и больше. В пыльце обнаружено свыше 250 различных биологически активных веществ. Она содержит белки (до 30 %), жиры, углеводы, аминокислоты, ненасыщенные жирные кислоты, фосфолипиды, микроэлементы, витамины. Основной углевод — фруктоза. Кроме нее в пыльце есть крахмал, клетчатка, другие сложные полимерные углеводы, например, полисахариды типа каллозы (1,3-бетаглюкан). Важными компонентами пыльцы являются фенолы, флавоноиды и стерины. К специфической группе веществ, характерных для пыльцы, относятся секалозиды (бензоксизиноны) — гликозиды циклических гидроксамовых кислот, обладающие противоопухолевой активностью, в частности, при раке предстательной и молочной желез, противовоспалительным, антимикробным, антимутагенным, спазмолитическим, гепатозащитным, антиостеопорозным и коллагеносохраняющим эффектами [5, 6].

При недостатке или отсутствии пыльцы пчелы перестают выделять маточное молочко, воск, нарушается развитие пчелиной семьи. Пыльца имеет медово-цветочный аромат и пряный, сладковатый вкус. Цвет пыльцы варьирует от желтого до фиолетового. Пыльца различных растений имеет свои особенности влияния на организм.

Из пыльцы пчелы вырабатывают пергу или пчелиный хлеб (по вкусу перга напоминает намазанный медом ржаной хлеб). Перга — это законсервированная в ячейках сот под слоем меда без доступа кислорода пыльца. Основной консервант — молочная кислота, образующаяся из веществ пыльцы под влиянием ферментов пчел, бактерий и грибов. В ячейках сот перга часто имеет слоистый разноцветный вид, обусловленный складыванием в одной ячейке пыльцы от разных растений. Пыльца и перга — вторые после меда блюда для пчел. Однако питательная ценность перги в 3 раза выше пыльцы. Перга значительно лучше, чем пыльца, усваивается в пищеварительном тракте, так как в ней разрушены прочные трудноперевариваемые оболочки частиц пыльцы. Пыльца и перга являются основой для выработки маточного молочка.

Основные эффекты пыльцы и перги [1–3, 5, 6, 8, 9]:

- антиоксидантный;
- снижение уровня мочевой кислоты в крови;
- уменьшение свертываемости крови;
- мочегонное действие;
- уменьшение содержания холестерина в крови;
- снижение повышенного уровня глюкозы в крови за счет усиления выделения инсулина поджелудочной железой;
- увеличение количества гемоглобина и эритроцитов в крови;
- стимуляция регенерации тканей;
- гепатопротекторное действие;

- противовоспалительное действие;
- антиоксидантное действие;
- стимуляция иммунитета;
- антиинфекционное (антимикробное) действие;
- противоопухолевое действие;
- увеличение спермообразования;
- повышение либидо и половой потенции;
- желчегонное действие;
- укрепление стенки капилляров;
- радиозащитное действие;
- повышение аппетита;
- выраженный анаболический эффект;
- общеукрепляющее действие.

Показания к применению пыльцы и перги:

- язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки;
- гастриты;
- колиты;
- энтериты;
- холециститы;
- гепатиты;
- цирроз печени;
- анемии;
- постинфекционная астения;
- простатиты;
- везикулиты;
- психосоматические расстройства;
- физическое и психическое перенапряжение;
- подагра;
- экзема;
- псориаз;
- ишемическая болезнь сердца;
- артериальная гипертензия;
- артериальная гипотония;
- миокардиты;
- мочекаменная болезнь;
- инфекции почек и мочевыводящих путей;
- абстинентный синдром у лиц с алкогольной и другими химическими зависимостями;
- профилактика атеросклероза;
- снижение токсического действия на организм противоопухолевых средств;
- ускорение заживления ран;
- гипотрофия у детей и др.

Маточное молочко («королевское желе») — высокопитательный продукт, вырабатываемый верхнечелюстными, глоточными, постцеребральными и торакальными железами нелетных рабочих пчел-кормилиц в возрасте от 5 до 15 дней для питания пчелиной матки и ее личинок. Маточное молочко содержит 10–18 % белка, 9–15 % углеводов, 1,5–7 % жиров, включая боль-

шое количество витаминов, макро- и микроэлементов (калий, натрий, кальций, фосфор, магний, железо, марганец, медь, кобальт, цинк, кремний и др.), органических кислот, включая аминокислоты, в том числе незаменимые для человеческого организма, производные гидроксидецеиновой кислоты, пептиды (роялактин, роялизин и др.), ферменты (инвертаза, амилаза, глюкозооксидаза, холинэстераза и др.), гормоны, нуклеиновые кислоты и др. Свежее маточное молочко представляет сметано- или желеобразную желтовато-белую массу с острым кисло-сладким вкусом и специфическим запахом [4].

Япония, например, ежегодно импортирует около 200 тонн этого продукта (главный мировой импортер маточного молочка) дополнительно к собственному производству. Оно включается в рацион питания школьников и лиц пенсионного возраста. Ежегодно население Японии потребляет свыше 1000 тонн маточного молочка.

Маточное молочко при его употреблении внутрь оказывает иммуностимулирующее, антимикробное (подавляет размножение бактерий, вирусов, грибков, некоторых простейших, в частности, за счет 10-гидрокси-2-децеиновой кислоты), противовоспалительное, радиозащитное, противоопухолевое действие, снижает повышенный уровень глюкозы и холестерина в крови, увеличивает содержание эритроцитов и гемоглобина, расширяет сосуды, улучшает кровообращение в органах и тканях, активизирует синтетические процессы в организме, в том числе ускоряет заживление костей при переломах, улучшает сон, память, аппетит, повышает умственную и физическую работоспособность, жизненный тонус, улучшает самочувствие, состояние сердечной мышцы после инфаркта миокарда, стимулирует лактацию у кормящих женщин, препятствует преждевременному старению и т. д. [1–3, 6, 8, 9].

Перечисленные эффекты маточного молочка обуславливают возможность его применения при различных расстройствах жизнедеятельности. Применяется оно при анемиях, артритах, бесплодии, снижении половой потенции, переутомлении, ослаблении организма при резком изменении климатических условий, для профилактики эпидемических инфекционных заболеваний, во время экзаменационных сессий, спортивных тренировок, при климактерическом и метаболическом синдромах, кожном зуде, опрелостях и гипотрофии у детей, жирной себорее и т. д. Широко используется маточное молочко в косметических целях в виде кремов, мазей, лосьонов для восстановления упругости и эластичности кожи, предупреждения появления морщин [1–3, 8, 9].

Очень интересный продукт пчеловодства — **прополис** (*пчелиный клей, восковой клей, пчелиная смола, уза*). Это клейкая аморфная масса, обычно темно-зеленого цвета (от желто-зеленого до коричнево-черного), с ароматом березы, тополевыи почек, меда, ванилина и горьковато-пряным охлаждающим вкусом, вырабатываемая пчелами путем обработки секретом своих пищеварительных желез (челюстных и глоточных) смолистых веществ, собираемых с почек, листьев и коры различных растений и деревьев. Из прополиса выделено более 300 разнообразных веществ, включая фенольные соединения, ароматические кислоты, ненасыщенные жирные кислоты, аминокислоты, воски. Прополис содержит более десятка витаминов, двух десятков микроэлементов и много других биологически активных соединений. Очень важными компонентами прополиса являются природные антибиотики и вещества, обладающие противоопухолевой активностью (фенилэтиловый эфир кофейной кислоты, артепиллин С и др.). Фенилэтиловый эфир кофейной кислоты, содержащийся в большом количестве в прополисе, обладает еще и радиозащитным действием [6, 12, 14, 18].

Пчелы используют прополис в качестве водо- и термоизолирующего материала для замазывания щелей в ульях, герметического покрытия их стенок, поддержания постоянства микроклимата в ульях, регулирования просвета летка в зависимости от температуры окружающей среды, в частности, его уменьшения зимой, укрепления сотов путем добавления прополиса

к воску как основному строительному материалу сотов, полирования ячеек сот перед откладыванием в них маткой яиц, защиты от патогенных микроорганизмов (вирусов, бактерий, грибов), бальзамирования (в сочетании с воском) пробравшихся в улей достаточно крупных животных (насекомых, слизняков, лягушек, ящериц, мышей), которых пчелы не могут выбросить из улья после их умерщвления ужалыванием (трупы мумифицируются и не разлагаются) и др. [2, 6].

Прополис прямо или косвенно влияет практически на все биохимические реакции и физиологические процессы в организме, обладает тонизирующим и общеукрепляющим действием. Биофлавоноиды, содержащиеся в прополисе, укрепляют стенку капилляров, стабилизируют мембраны клеток. Под влиянием прополиса тормозится агрегация тромбоцитов, уменьшается содержание холестерина в крови, повышается активность иммунной системы, в частности, увеличивается содержание в крови различных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, усиливается выработка антител к инфекционным и неинфекционным агентам, возрастает активность макро- и микрофагов, повышается уровень антиинфекционного белка пропердина. Прополис подавляет чрезмерную активность окислительных процессов, усиливает гормональную активность коркового вещества надпочечников, повышает моторную активность желудка и кишечника, снижает артериальное давление, увеличивает способность зрительного анализатора адаптироваться в темноте. Прополис обладает противовоспалительным и противоаллергическим действием (крайне редко отмечается аллергия на сам прополис), что проявляется, в частности, в уменьшении зуда кожи, проявляет местноанестезирующее действие (превосходит кокаин в 3,5 раза, новокаин — в 5,2 раза), оказывает антитоксическое действие, защищает печень от повреждения гепатотропными ядами, обладает радиозащитными свойствами. Антиатеросклеротическое действие прополиса связано с его способностью влиять на обмен липидов (снижает содержание в сыворотке крови холестерина и триацилглицеролов, повышает уровень липопротеинов высокой плотности, выводящих холестерин из стенок сосудов) и подавлять воспаление и другие деструктивные процессы в стенке артерий. Применение прополиса при артериальной гипотонии способствует повышению артериального давления. Рассасывающее действие прополиса используется при удалении мозолей, избавлении от рубцов. Прополис стимулирует регенерацию тканей, что связано, в частности, с наличием в его составе полифенольных соединений, ускоряет заживление кожных ран и срастание костей при переломах, повышает количество лейкоцитов, тромбоцитов, эритроцитов и гемоглобина в крови при сниженных их исходных показателях, укрепляет эмаль зубов, препятствует развитию кариеса, обладает дезодорирующими свойствами, способствует остановке кровотечений при повреждении тканей, после удаления миндалин и др. Прополис уменьшает чувство усталости, тревоги, снижает утомляемость, улучшает настроение [1–3, 6, 8, 9, 12, 14, 18].

Прополис обладает выраженной антимикробной активностью, что связано с наличием в его составе не менее 30 веществ, обладающих бактерицидным и бактериостатическим действием (галангин, кофеиновая, феруловая и бензойная кислоты, фитонциды и др.). Он подавляет жизнедеятельность более 20 патогенных для человека бактерий, вызывающих туберкулез, сибирскую язву, брюшной тиф и паратиф, дизентерию, сифилис, многие другие инфекции мягких тканей и внутренних органов. Выражено и противовирусное действие прополиса в отношении возбудителей гриппа и других ОРВИ, герпетической инфекции. Прополис обладает противогрибковым действием в отношении кандид, трихофитов, эпидермофитов, тормозит рост патогенных для человека грибов *Aspergillus parasiticus* и биосинтез выделяемых ими афлатоксинов, подавляя экспрессию соответствующих генов — *nor-1*, *ver-1* and *omtA* [21]. Прополис усиливает действие некоторых антибиотиков (аминогликозиды, тетрациклины, пенициллины, полимиксины), ослабляет их некоторые отрицательные побочные эффекты, тормозит формирование антибиотикорезистент-

ности у бактерий, что является сейчас серьезнейшей проблемой медицины. Отмечена зависимость выраженности антиинфекционных свойств прополиса от его окраски, зависящей от химического состава: наиболее заметно подавляет жизнедеятельность патогенных микроорганизмов прополис с ярко-оранжевой окраской, наименее активен прополис серого цвета.

С учетом многообразных свойств прополиса его препараты находят применение [1–3, 8, 9]:

– при *сердечно-сосудистых заболеваниях* (артериальная гипертония, артериальная гипотония, атеросклероз, стенокардия, инфаркт миокарда, миокардит, эндокардит, облитерирующий эндартериит, тромбоз, тромбоз вен и др.);

– *заболеваниях нервной системы* (радикулит, полирадикулоневрит, неврит лицевого и слухового нервов, невралгия тройничного нерва, энцефалит, менингит, арахноидит, остаточные явления после травм головного и спинного мозга, травматический плексит, рассеянный склероз, синингомиелия, эпилепсия, мигрень, болезнь Меньера, бессонница или повышенная сонливость и др.);

– *болезнях пищеварительного тракта* (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, хронический гастрит, дуоденит, панкреатит, гепатит, холецистит, колит, геморрой, трещина прямой кишки и др.);

– *болезнях органов дыхания* (бронхит, пневмония, бронхиальная астма, ларинготрахеит, синусит, ринит, ринофарингит и др.);

– *заболеваниях почек и мочевыводящих путей* (острый и хронический гломерулонефрит, пиелонефрит, мочекаменная болезнь, хроническая почечная недостаточность, энурез, цистит, уретрит, простатит, аденома предстательной железы и др.);

– *заболеваниях кожи* (псориаз, ихтиоз, алопеция, системная красная волчанка, дерматомиозит, розовый лишай, себорея, крапивница, десквамативная эритродермия, нейродермит, экзема, дерматиты, медикаментозные токсидермии, фурункул, карбункул, гидраденит, панариций, ожоги, обморожения, длительно незаживающие язвы, травматические и огнестрельные раны, пролежни, трещины сосков у кормящих матерей, потливость ног, удаление мозолей, омолозостей, бородавок, гангрена, и др.);

– *поражениях суставов* (ревматизм, ревматоидный артрит, узелковый периартериит, подагра, остеохондроз и др.);

– *гинекологических заболеваниях* (аднексит, метрит, эндоцервицит, вагинит, эрозия шейки матки, крауроз и лейкоплакия вульвы, мастит и др.);

– *эндокринных заболеваниях* (сахарный и несахарный диабет, узловой и диффузный зоб);

– *болезнях уха* (наружный и средний отит, тугоухость);

– *глазных болезнях* (конъюнктивит, кератит, включая язвы роговицы, блефарит, ожоги глаз, послеоперационные состояния);

– *болезнях крови* (анемии, лейкопении, тромбоцитопении);

– *сексуальных расстройствах* (некоторые формы импотенции);

– *стоматологических заболеваниях* (стоматит, хейлит, глоссит, гингивит, альвеолит, периодонтит, пародонтоз, кариес, лейкоплакия, повышенная чувствительность твердых тканей зубов и др.);

– *инфекционных заболеваниях* (туберкулез, грипп, брюшной тиф, дизентерия, сальмонеллез, лептоспироз, герпетическая инфекция, ангина, рожистое воспаление, дифтерия, склерома, оспа, бруцеллез, малярия, вирусный гепатит, дисбактериоз, микозы (кандидоз, эпидермофития, трихофития, актиномикоз, бластомикоз) и др.);

– *лучевых поражениях* (профилактика и лечение повреждений тканей при лучевой терапии в онкологии; оказывает защитное действие при облучении в летальной дозе).

Препараты прополиса могут применяться внутрь и наружно, включая жевание и втирание в область акупунктурных точек. Разработаны лекарственные формы прополиса в виде таблеток, жевательных резинок, леденцов, настоев, настоек, жидких и густых экстрактов, эмульсий, мазей, паст, пластырей, горчичников, масел, кремов, лосьонов, аэрозолей для ингаляций, ректальных, вагинальных и внутриматочных суппозиторий и шариков. Разработаны даже препараты прополиса для инъекций. Однако с медицинской целью препараты прополиса используются крайне недостаточно.

Воск. Пчелиный воск является твердым веществом, имеющим аромат меда и прополиса. Он образуется специальными железами медоносных пчел и выделяется у них на брюшке в виде белесоватых пластинок. Пчелы используют воск для строительства сот и запечатывания ячеек с медом. Цвет воска колеблется от белого до желто-бурого. Примесь прополиса может расширять цветовую гамму воска до зеленоватого оттенка. Свежий весенний воск имеет, как правило, белый цвет. В более поздние сроки он приобретает более темную окраску. В состав воска входит около 50 различных веществ. Среди них свободные жирные кислоты (церотиновая, неоцеротиновая, монтановая, мелиссовая, олеиновая и др.), ароматические соединения, спирты, сложные эфиры спиртов и насыщенных жирных кислот, смолы, витамины (особенно много в воске β -каротина), минеральные вещества и др.

Пчелиный воск используется в пищевой промышленности в качестве добавки Е-901. Он обладает антибактериальным и противовоспалительным действием, находит широкое применение в качестве основы для изготовления мазей, эмульсий, кремов, помад, твердых духов, пластырей. При жевании пчелиный воск хорошо очищает зубы (не прилипая к ним) и освежает дыхание, обладая дезодорирующим действием. Препараты с воском повышают эластичность и омолаживают кожу. Хороший эффект они оказывают при уходе за сухой и увядающей кожей, устранении мозолей, лечении пациентов с ранами, ожогами, трофическими язвами, экземой, воспалительными процессами в коже, в том числе при угрях, и на слизистых оболочках, например при стоматитах, трещинах на губах. При попадании воска внутрь, например, проглатывании его после жевания, он сорбирует токсины, стимулирует перистальтику и улучшает состояние кишечника при дисбактериозе [1–3, 6].

Пчелиный подмор — это тела медоносных пчел, погибших в естественных или специально созданных для сбора подмора условиях. Выделяют весенний, летний, осенний и лечебный подморы. Весенний подмор получают после чистки перезимовавших ульев. Он наименее ценен, так как в нем много различных примесей и мало пчелиного яда. Наиболее ценным является осенний подмор, в котором накапливается много полезных веществ. Лечебный подмор получают из пчел, которые отдали свой яд во время процедуры пчеложаления. Состав пчелиного подмора характеризуется высоким содержанием белка (50–80 %) и меланина (до 20–30 %). В нем много свободных аминокислот, витаминов, микроэлементов и других веществ. В настоящее время описано более 10 препаратов, полученных из тел пчел. Главное действующее начало подмора — хитозановый комплекс, содержащий пчелиный яд, гепарин, меланин, глюкозамин и др. Препараты на основе пчелиного подмора (отвары, настои, настойки, экстракты, мази, линименты) оказывают противомикробное действие (антибактериальное, противовирусное, антилямблиозное), антиоксидантное, радиозащитное, иммуностимулирующее, антитоксическое (соединительнотканнные волокна в телах пчел являются прекрасным сорбентом для связывания токсинов в желудочно-кишечном тракте, включая соли тяжелых металлов), гепатопротекторное, гемостатическое, гипополипидемическое, в частности, гипохолестеролемическое, антацидное (нейтрализуют соляную кислоту в желудочном соке), способствуют заживлению

эрозий и язв в желудочно-кишечном тракте, стимулируют регенерацию тканей. Препараты пчелиного подмора используются при лечении пациентов с гингивитами, стоматитами, пародонтозом, конъюнктивитами, кожными ранами и язвами, ожогами, переломами костей, тромбофлебитами, сахарным диабетом, маститами и мастопатиями, артериальной гипертонией, лямблиозом и др. [1–3, 6, 8, 9].

Трутневый гомогенат (гомогенат трутневых личинок, трутневый расплод, трутневое молочко) сравнительно новый на отечественном рынке продукт пчеловодства, хотя история его применения уходит корнями в глубокое прошлое. Трутневый гомогенат получают из 7-дневных личинок пчелиных трутней, которых измельчают до получения однородной (гомогенной) сметанообразной массы светло-желтого цвета с запахом печеного хлеба и сладковатым вкусом. Технологически получить его очень непросто, поэтому продукт достаточно дорогой.

Трутневое молочко в своем составе содержит белок (10–20 %), аминокислоты (11,4 %), углеводы (1,0–5,5 %), включая глюкозу, фруктозу и сахарозу, жиры (5,0–6,3 %), витамины, ферменты, половые гормоны (андрогены, эстрогены, прогестерон), макро- и микроэлементы и т. д. По содержанию витамина D трутневый гомогенат превосходит даже рыбий жир. В гомогенате много пантотеновой кислоты [6].

Трутневый гомогенат способствует повышению физической выносливости и снижению артериального давления, повышает либидо и половую потенцию у мужчин, увеличивает толерантность к высоким физическим и эмоциональным нагрузкам, стимулирует развитие детского организма, обладает выраженным биостимулирующим и общеукрепляющим действием, противоопухолевой активностью, повышает аппетит, улучшает сон, снижает уровень холестерина в крови и др. Рекомендуется его применение в периоды высоких физических, умственных и эмоциональных нагрузок, при истощении организма после инфекционных заболеваний, климактерическом синдроме у мужчин и женщин, для лечения психических расстройств и заболеваний пищеварительной системы, тромбофлебита и трофических язв и т. д. [2, 6, 8, 9].

Во многих странах трутневый гомогенат применяется для производства пищевых добавок, различных лекарственных и косметических средств. В Японии, например, употребляют отваренные и жареные трутневые личинки; как приправу используют трутневый расплод в соевом соусе. По данным НИИ пчеловодства (г. Рыбное, РФ) трутневый гомогенат по своим оздоровительным свойствам даже превосходит маточное молочко [2, 6].

Отдельно следует остановиться на противоопухолевой активности продуктов пчеловодства. Научными исследованиями доказана способность продуктов пчеловодства влиять на возникновение и течение злокачественных новообразований [2, 6, 11, 14, 16, 17, 18]. Есть наблюдения за животными, свидетельствующие о том, что длительный ежедневный прием меда предупреждает развитие у них некоторых видов злокачественных новообразований. Приводятся данные примерно о 2000 столетних жителей Болгарии, которые постоянно употребляли мед и у которых не отмечено ни одного случая развития злокачественных опухолей.

При сравнении противоопухолевой активности различных образцов меда в отношении клеток рака молочной железы различных линий обнаружено, что цитотоксический эффект возрастает в ряду мультицветочный — сосновый — кедровый — каштановый, что прямо коррелирует с увеличением в них общего содержания фенольных соединений и темным цветом. Кроме того, в таком же порядке возрастает и антиоксидантная активность образцов меда [11].

В опытах на мышах и крысах было изучено влияние меда, разведенного водой в соотношении 1:4 и вводимого животным через зонд в желудок, на развитие некоторых прививаемых экспериментальных злокачественных опухолей — лимфосаркомы Плисса, саркомы 180 Крекера, карцино-

мы 3LL, асцитной карциномы Эрлиха и меланомы В-16. Установлено, что введение меда до прививки опухолей приводило к торможению роста новообразований на 29–48 %, значительному подавлению метастазирования и увеличению продолжительности жизни животных-опухоленосителей на 21–27 %. Введение разведенного меда после прививки опухолей оказывало более значительный эффект. Рост опухолей тормозился на 27–47 %, значительно подавлялся процесс метастазирования, а продолжительность жизни животных увеличивалась до 75 % (у мышей с асцитной карциномой Эрлиха). У крыс с лимфосаркомой Плисса, которым вводился мед, метастазы обнаруживались только у 20 % животных, а в контрольной группе — у 100 %. Противоопухолевая активность меда более выражена на ранних стадиях развития экспериментальных опухолей. Установлено также, что совместное применение меда и противоопухолевых лекарственных средств (5-фторурацила и циклофосфана) оказывало более выраженный противоопухолевый эффект. Так, у мышей с меланомой В-16 5-фторурацил задерживал рост опухоли на 10 %, а в сочетании с медом — на 47 %. Число метастазов у этих животных было в 2 раза меньше, чем у животных, которым вводился только 5-фторурацил. Кроме того, введение меда снижало токсичность противоопухолевых препаратов. Таким образом, накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что мед обладает противоопухолевой активностью, тормозит рост опухолей и метастазирование, усиливает действие противоопухолевых лекарственных средств, уменьшает их токсичность и увеличивает продолжительность жизни животных с опухолями [2, 3, 6, 16, 17].

Высокую противоопухолевую активность проявляет и прополис. Так, введение экстракта прополиса через зонд в желудок экспериментальным животным на 27 % замедляет рост карциномы легких Льюиса у мышей, на 45 % снижает количество метастазов и на 74% — их общую массу. Под влиянием прополиса на 38 % тормозился рост карциносаркомы Уокера 256 у крыс. Прополис, также как и мед, усиливал противоопухолевую активность циклофосфана [6, 14, 17, 18]. Получены неплохие результаты при использовании препаратов прополиса в терапии пациентов с раком кожи, губы, гортани, легких, пищевода, желудка, кишечника, матки, сарком разной локализации, лейкозов.

Из прополиса и меда выделено несколько химических веществ с выраженной противоопухолевой активностью — клеродановый дитерпеноид, кофейнохинные кислоты, артепиллин С, флавоноиды и др. Клеродановый дитерпеноид, имеющий эмпирическую формулу $C_{20}H_{32}O_3$, подавляет синтез нуклеиновых кислот в ядрах опухолевых клеток, не влияя при этом на нормальные клетки в отличие от классических противоопухолевых лекарственных средств. Это вещество, например, предупреждает возникновение рака кожи у мышей при действии на них сильного канцерогена — 7,12-диметилбензантрацена. Кофейнохинные кислоты оказывают профилактическое действие в отношении возникновения рака кожи и толстого кишечника при действии некоторых химических канцерогенов на экспериментальных животных. Фенилэтиловый эфир кофейной кислоты прополиса дозозависимо ингибирует рост клеток злокачественных опухолей, вызывает, в частности, значительную супрессию транскрипционного b-катенин/Tcf4 фактора, снижает экспрессию циклина D1, с-тус и индуцирует апоптоз в культуре клеточных линий колоректального рака (HCT116 и SW480). Флавоноиды прополиса (кемпферид, эрманин, кверцетин и др.) тормозят рост многих линий раковых клеток в культуре [3, 6, 14, 16–18].

В составе маточного молочка обнаружены 10 деценовых кислот, относящихся к ненасыщенным жирным кислотам, у которых выявлена противоопухолевая активность в отношении клеток лимфосаркомы, рака молочной железы, карциномы Эрлиха. Наиболее выраженный противоопухолевый эффект отмечен у 10-гидрокси-2-деценовой кислоты, причем введение в структуру молекулы кето- или амидной группы значительно уменьшает или полностью устраняет противоопухолевую активность. Прямое угнетающее влияние на жизнедеятельность

злокачественных клеток (опухолевых В-лимфоцитов, выделенных из крови пациента с лимфолейкозом) установлено и у экстрактов перги [4, 6].

Обнаруженный в экспериментальных и клинических исследованиях противоопухолевый эффект продуктов пчеловодства связан не только с прямым повреждающим действием их химических компонентов на опухолевые клетки, но и с повышением устойчивости организма к возникновению злокачественных опухолей в результате увеличения активности системы противоопухолевой защиты организма, в частности, противоопухолевого иммунитета. Как известно, регулярное употребление продуктов пчеловодства повышает иммунореактивность организма при ее снижении, а угнетение иммунной системы сопряжено с увеличением риска развития онкологических заболеваний. Применение продуктов пчеловодства приводит к понижению вязкости и свертываемости крови. В то же время эти показатели увеличиваются при развитии злокачественных опухолей и применение фармакологических средств, уменьшающих вязкость и свертываемость крови, например, гепарина, тормозит рост опухолей и метастазирование. Использование продуктов пчеловодства ослабляет проявления психической депрессии, а психическая депрессия, как известно, повышает риск развития злокачественных опухолей. Пчелопродукты могут оказывать противоопухолевое действие и за счет усиления антитоксической функции печени и других органов, нормализации работы толстого кишечника, в котором из поступающей в организм пищи в результате гнилостно-броидильных процессов образуется много токсинов, мутагенов, канцерогенов и др.

Очевидно, что продукты пчеловодства являются важными природными факторами сохранения и укрепления здоровья человека, которые при длительном и рациональном применении могут снизить риск развития злокачественных опухолей за счет повышения эффективности функционирования системы противоопухолевой защиты организма и непосредственного повреждающего влияния некоторых их химических компонентов на образующиеся в организме опухолевые клетки. Особенно показано применение продуктов пчеловодства в тех случаях, когда больной принимает лекарства, у которых установлена возможность проявления канцерогенной активности (антибиотик левомецетин, противовоспалительное средство фенилбутазон, противоэпилептическое — дифенин, снотворное — фенобарбитал, противоаритмическое — амиодарон, жаропонижающее — парацетамол, слабительное — фенолфталеин, средства с антиаритмической, антиангинальной и антигипертензивной активностью — верапамил, нифедипин, дилтиазем и др.).

Заключение. Таким образом, представленная информация о продуктах пчеловодства и содержащихся в них биологически активных веществах красноречиво свидетельствует об их огромном здравосозидательном потенциале, который при грамотном использовании может дать прекрасный эффект при решении задач сохранения и укрепления здоровья нации.

Список литературы

1. Гиноян, Р.В. Продукты пчеловодства и апитерапия / Р.В. Гиноян, А.Е. Хомутов, О.В. Лушников. — Н. Новгород: ННГУ, 2008. — 648 с.
2. Лудянский, Э. Руководство по апитерапии / Э. Лудянский. — Вологда, 1994. — 461 с.
3. Лукьянов, Н.Л. Мед. Лечение продуктами пчеловодства / Н.Л. Лукьянов. — СПб.: Полигон, 1999. — 141 с.
4. Орлов, Б.Н. Маточное молочко пчел как универсальный биорегулятор / Б.Н. Орлов, М.Н. Иващенко. — Н. Новгород: ДЕКОМ, 2010. — 184 с.
5. Пыльца цветочная (обножка пчелиная) в фармации и медицине / А.И. Тихонов [и др.]. — Харьков: Оригинал, 2006. — 310 с.
6. Современные проблемы пчеловодства и апитерапии / А.З. Брандорф [и др.]. — Рыбное: НИИ пчеловодства, 2019. — 338 с.

7. Третьяков, Ю.Н. Пчелиный яд. Способы получения пчелиного яда / Ю.Н. Третьяков. — СПб. : Диля, 2008. — 112 с.
8. Хисматуллина, Н.З. Практическая апитерапия / Н.З. Хисматуллина. — Пермь: Экслибрум, 2009. — 336 с.
9. Шкендеров, С. Пчелиные продукты / С. Шкендеров, Ц. Иванов. — София: Земиздат, 1985. — 232 с.
10. Яд пчелиный в фармации и медицине / А.И. Тихонов [и др.]. — Харьков: Оригинал, 2010. — 279 с.
11. Anatolian honey is not only sweet but can also protect from breast cancer: Elixir for women from artemis to present / M. F. Seyhan [et al.] // IUBMB Life. — 2017. — Vol. 69, № 9. — P. 677–688.
12. Anjaly, K. Radio-modulatory potential of caffeic acid phenethyl ester: A therapeutic perspective / K. Anjaly, A. B. Tiku // Anticancer Agents Med. Chem. — 2018. — Vol. 18, № 4. — P. 468–475.
13. Azman, K. F. Honey as an antioxidant therapy to reduce cognitive ageing / K.F. Azman, R. Zakaria // Iran. J. Basic. Med. Sci. — 2019. — Vol. 22, № 12. — P. 1368–1377.
14. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review / S.I. Anjum [et al.] // Saudi. J. Biol. Sci. — 2019. — Vol. 26, № 7. — P. 1695–1703.
15. Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana* / D. Park [et al.] // Peptides. — 2014. — Vol. 53. — P. 185–193.
16. Ghramh, H. A. Study of anticancer, antimicrobial, immunomodulatory, and silver nanoparticles production by Sidr honey from three different sources / H.A. Ghramh, E.H. Ibrahim, M. Kilany // J. Food. Sci. Nutr. — 2019. — Vol. 8, № 1. — P. 445–455.
17. Premratanachai, P. Review of the anticancer activities of bee products / P. Premratanachai, C. Chanchao // Asian. Pac. J. Trop. Biomed. — 2014. — Vol. 4, № 5. — P. 337–344.
18. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting / L. M. Santos [et al.] // J. Sci. Food Agric. — 2020. — Vol. 100, № 4. — P. 1369–1382.
19. Sari, M.F. Determination of polychlorinated biphenyls in honeybee, pollen, and honey samples from urban and semi-urban areas in Turkey / M.F. Sari, A.E. Gurkan, F. Esen // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. — 2020. — Vol. 27, № 4. — P. 4414–4422.
20. Selection of yeasts from bee products for alcoholic beverage production / M. S. Silva [et al.] // Braz. J. Microbiol. — 2020. — Vol. 51, № 1. — P. 323–334.
21. The effect of propolis on inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth, aflatoxin production and expression of aflatoxin biosynthesis pathway genes / H. Hosseini [et al.] // J. Environ. Health. Sci. Eng. — 2020. — Vol. 18, № 1. — P. 297–302.

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM APICULTURE PRODUCTS AND THEIR EFFECT ON HUMAN HEALTH

Semenenya I.N.

*Republican Research Unitary Enterprise Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The article provides important information about apiculture products (apitoxin, honey, royal jelly, pollen, bee bread, propolis, beewax, dead bees and drone homogenate), biologically active substances that are contained in them and effects of apiculture products, as well as some compounds and combined preparations isolated from them on biochemical reactions, physiological and pathological processes in the body and course of diseases. A great potential of apiculture products for solution of problems of preservation and strengthening of human health and their safety and efficacy, as well as necessity of further development of research in this direction were demonstrated.*

ВЛИЯНИЕ L-NAME НА СПЕКТР АМИНОКИСЛОТ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ ГИППОКАМПА И КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Смирнов В.Ю.¹, Разводовский Ю.Е.², Дорошенко Е.М.¹, Максимович Н.Е.¹

¹*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь;*

²*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. В настоящей работе изучен пул свободных аминокислот и биогенных аминов в гиппокампе и коре больших полушарий крыс при субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) на фоне введения N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME). Субтотальная ишемия головного мозга (ГМ) индуцирует дисбаланс в пуле аминокислот и их производных гиппокампа и коры ГМ. Предварительное введение L-NAME частично нормализует эти нарушения, однако вызывает изменение уровней ароматических аминокислот (ААК), аргинана, гистидина, треонина и турина.

Введение. Инсульт является одной из ведущих причин инвалидности и смертности во многих странах мира [6]. Высокая летальность от ишемического инсульта в значительной степени объясняется недостаточной изученностью его патогенеза [5, 7]. Поэтому одной из задач экспериментальной медицины является выяснение и детализация механизмов ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга.

Исследования, проведенные с использованием ингибиторов различных изоформ NO-синтазы, свидетельствуют о важной роли монооксида азота (NO) в патогенезе ишемического повреждения головного мозга [5, 8]. Одним из направлений детализации патогенетических механизмов ишемического инсульта является изучение изменений пула аминокислот и их производных в различных отделах головного мозга [2, 3, 4, 8].

Целью исследования явилась характеристика изменений пула аминокислот и биогенных аминов гиппокампа и больших полушарий головного мозга крыс при субтотальной ишемии головного мозга на фоне введения L-NAME.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 18 белых беспородных крысах-самках (по 6 животных в каждой группе), массой 180–220 г. Крысам опытных групп моделировали субтотальную ишемию головного мозга (СИГМ) путем перевязки обеих сонных артерий в течение часа. L-NAME вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг непосредственно перед перевязкой общей сонной артерии. Контрольную группу составили ложнооперированные животные, получавшие эквивалентное количество изотонического раствора NaCl. Все оперативные манипуляции проводились в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (60 мг/кг). После извлечения головного мозга (ГМ) осуществляли изъятие фрагмента гиппокампа и фрагмента лобной доли больших полушарий (кора с подлежащим белым веществом) на стороне перевязки с их последующим замораживанием в жидком азоте. Подготовка пробы для исследования

включала гомогенизацию в 10-кратном объеме 0,2М хлорной кислоты, центрифугирование в течение 15 мин при 13000 g при 4 °С с последующим отбором супернатанта.

Спектр определяемых соединений включал протеиногенные аминокислоты, орнитин, цитруллин, ряд родственных соединений (таурин, α -аминобутират и др.) и биогенные амины. Анализ проводился на хроматографе Agilent 1100 методом обращенно-фазной хроматографии с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой в Na-боратном буфере. Детектирование фотометрическое на длине волны 338 нм (для определения АК) и флуориметрическое (276/345 нм) (для разделения биогенных аминов). Использовалась колонка *Zorbax Eclipse Plus C18*, 3,5 мкм, 2,1 × 150 мм, Идентификацию и количественный анализ производили в программе *Agilent ChemStation B.04.01* [481], калибровка метода осуществлялась с применением концентрата стандартной смеси аминокислот фирмы «Sigma-Aldridge». Используемые подвижные фазы: 0,1М Na-ацетатный буфер (pH 6,25 и 5,75); водные растворы ацетонитрила и метанола (60 % об./об.). Разделение проводили с градиентным элюированием за 78 мин; температура колонки 34 °С. Для разделения биогенных аминов использовалась подвижная фаза: 0,05 М NaH_2PO_4 , 0,024 М CH_3COOH , 480 мг/л октилсульфоната натрия, 1,5 мл/л дибутиламина, 7 % ацетонитрила (об.). В работе использовались реактивы квалификации не ниже хч. Тридистиллированную воду для подвижных фаз пропускали через патрон «Norganic» (Millipore, США), подвижные фазы фильтровали через мембранный фильтр 0,22 мкм [1].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы R. Для оценки влияния факторов применялся параметрический дисперсионный анализ (ДА) с использованием поправки Тьюки для апостериорного сравнения показателей. В случае невыполнения условий применимости параметрического ДА, использовался непараметрический перестановочный тест *ezPerm* из пакета *ez*. Сравнение влияния факторов в двух исследуемых отделах ГМ производили с помощью ДА с использованием матрицы контрастов для апостериорного сравнения групп (процедура *glht* из пакета *multcomp*). Также использовались методы корреляционного и дискриминантного анализа.

Результаты исследования и их обсуждение. Субтотальная ишемия ГМ вызвала изменение пула аминокислот и их производных коры ГМ: происходило повышение уровней аспартата, β -аланина, валина и лейцина, снижение — глутамата, аспарагина, треонина, ГАМК, тирозина (рис. 1). Изменения касались в основном незаменимых и нейротрансмиттерных аминокислот (рис. 3) и способствовали обеднению общего пула свободных аминокислот коры ГМ. Анализ интегральных показателей аминокислотного фонда выявил также рост отношения суммарной концентрации аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ) и ААК (см. рис. 3), обусловленного как повышением концентраций АРУЦ, так и снижением ААК.

Снижение в коре ГМ 5-НИАА (рис. 4), основного метаболита триптофана, свидетельствует о торможении путей деградации серотонина. Причиной этого может служить развитие недостаточности пула ароматических аминокислот (косвенно об этом свидетельствует снижение уровня тирозина). Последнее в свою очередь может быть вызвано нарушением процессов транспорта ААК через гематоэнцефалический барьер при СИГМ, что подтверждается ростом АРУЦ в коре ГМ — основного конкурента ААК за общую систему транспорта.

Введение L-NAME, несмотря на нормализацию большинства нарушенных СИГМ уровней соединений (аспартата, глутамата, аспарагина, метионина, ГАМК, β -аланина, 5-НИАА) (см. рис. 1, 4), индуцировало аминокислотный дисбаланс в коре ГМ, выразившийся в снижении уровней глутамина, гистидина, таурина, триптофана, фенилаланина, тирозина, а также повышении концентраций треонина и аргинина. Таким образом, дефицит ААК при введении L-NAME усилился, как и рост соотношения АРУЦ/ААК (см. рис. 3). Однако содержание незаменимых компонентов АК пула

стало выше контрольных значений (см. рис. 3). Повышение аргинина объясняется действием L-NAME как антагониста NO-синтазы и, таким образом, свидетельствует об адекватности модели.

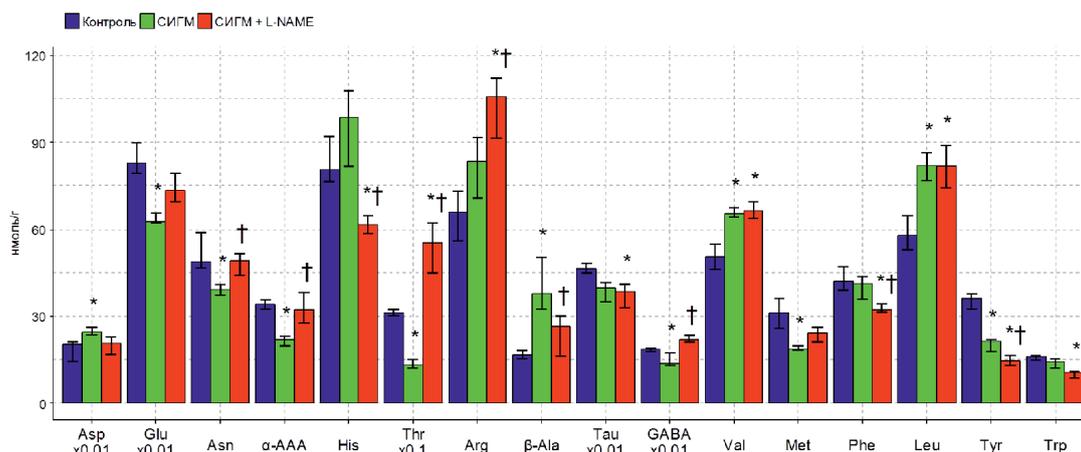


Рисунок 1 — Концентрация аминокислот и их производных в коре ГМ крыс при субтотальной ишемии ГМ на фоне введения L-NAME, нмоль/г.

Примечание: здесь и на рис. 2–4: представлены медианные значения с межквартильным интервалом; * — $p < 0,05$ при сравнении с контролем; † — $p < 0,05$ при сравнении с СИГМ.

В гиппокампе крыс субтотальная ишемия ГМ вызвала повышение уровней фенилаланина, гистидина, 3-метилгистидина, глутамина, α -аминобутирата и АРУЦ (рис. 2). Одновременно происходило снижение уровней треонина, тирозина и α -аминоадипиновой кислоты (α -AAA).

Нарушений пула биогенных аминов гиппокампа крыс при СИГМ не происходило (за исключением роста уровня диоксифенилацетата (DOPA)) (см. рис. 4). Однако корреляционный анализ свидетельствует о влиянии ишемии на активность их превращений. Так, в норме серотонин и его метаболит, 5-оксииндолацетат (5-НИАА), коррелируют положительно ($r = 0,98$, $p < 0,05$), при СИГМ их связь нарушается, уровень 5-НИАА начинает отрицательно коррелировать с уровнем 5-окситриптофана (5-НТР) ($r = -0,83$, $p < 0,05$). Также, при СИГМ происходит нарушение связей между тирозином и его метаболитами (DOPA и DOPAC). Все это может свидетельствовать о функциональных нарушениях серотониновой и дофаминовой систем в гиппокампе при ишемии, которые, однако, не сопровождаются изменениями уровней их компонентов.

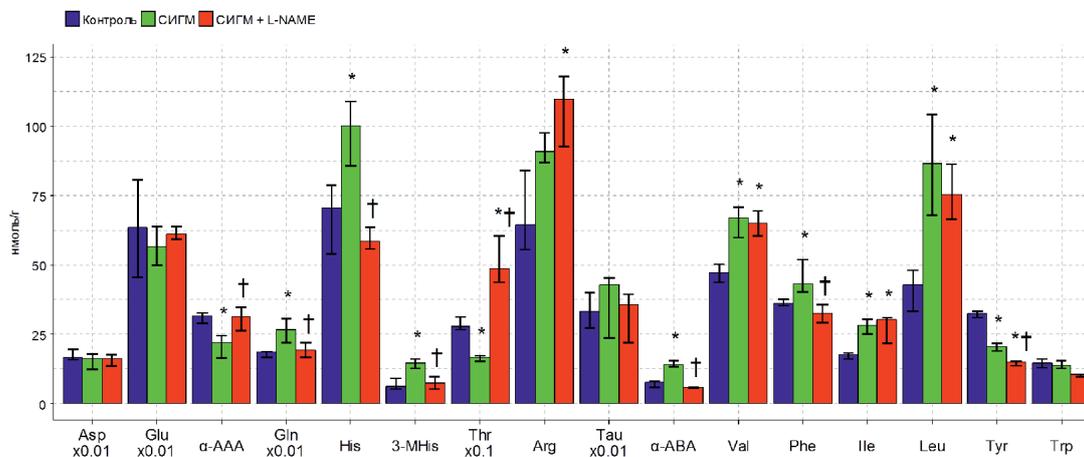


Рисунок 2 — Концентрация аминокислот и их производных в гиппокампе крыс при субтотальной ишемии ГМ и введения на ее фоне L-NAME

Влияние ишемии на интегральные показатели аминокислотного фонда гиппокампа было практически идентичным таковому в коре ГМ (см. рис. 3). Не регистрировались только снижения уровней ААК, суммарного пула АК и его незаменимых компонентов.

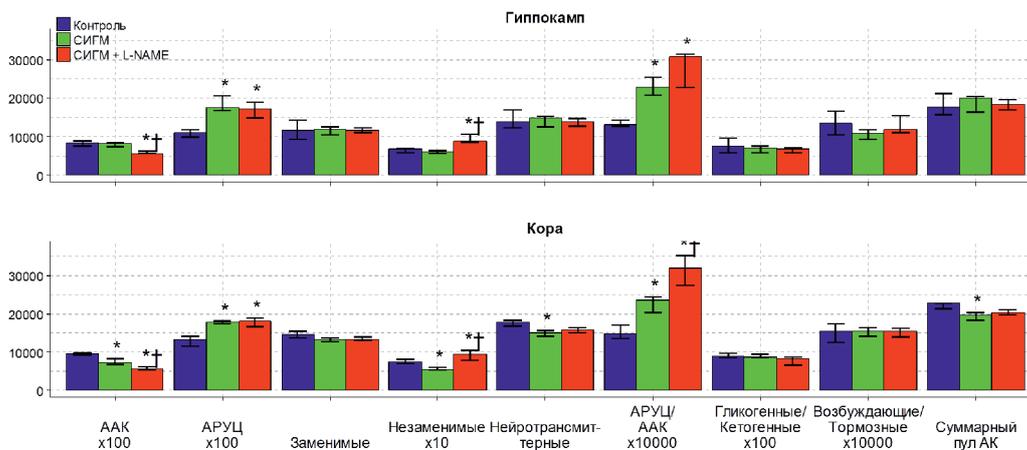


Рисунок 3 — Интегральные показатели аминокислотного фонда гиппокампа и коры ГМ крыс (нмоль/г) и их соотношения при субтотальной ишемии ГМ и введения на ее фоне L-NAME

Введение L-NAME предотвращало индуцированное СИГМ нарушение уровней фенилаланина, гистидина, 3-метилгистидина, глутамина, α -аминобутирата и α -аминоадипиновой кислоты, что может свидетельствовать о нормализующем влиянии L-NAME в отношении пула этих АК в гиппокампе. В то же время введение L-NAME не оказывало влияния на уровни АРУЦ и способствовало повышению концентраций треонина и аргинина. Снижение уровня тирозина при ишемии усиливалось введением L-NAME.

Введение L-NAME на фоне СИГМ не оказывало влияния на уровни биогенных аминов, за исключением нормализации уровня DOPA (см. рис. 4). В то же время корреляционный анализ свидетельствует о нормализующем действии L-NAME в отношении серотониновой системы гиппокампа на фоне СИГМ.

Снижение уровней ААК при введении L-NAME усилило, на фоне повышенного содержания АРУЦ рост соотношения АРУЦ/ААК (см. рис. 3). Наряду с этим отмечался рост суммарной концентрации незаменимых компонентов АК пула и обусловленное этим снижение доли заменимых аминокислот в общем пуле.

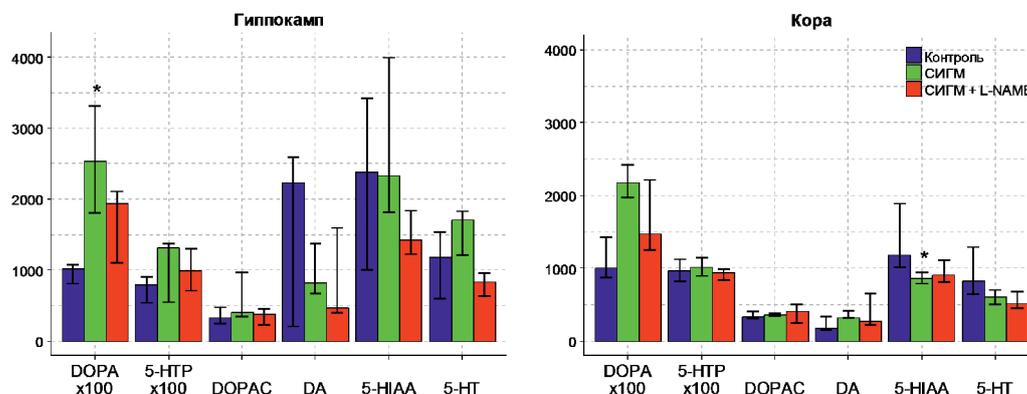


Рисунок 4 — Концентрация биогенных аминов в коре и гиппокампе ГМ крыс при субтотальной ишемии ГМ и введения на ее фоне L-NAME, пмоль/г

Сравнение эффектов СИГМ и введения L-NAME в коре и гиппокампе ГМ позволяет выделить группу соединений, имеющих особенности реакции на эти факторы в зависимости от отдела ГМ. Так, уровень аспартата на фоне СИГМ рос только в коре ГМ, оставаясь неизменным в гиппокампе, при введении L-NAME его уровень нормализовался (рис. 5). Уровень орнитина и ГАМК в гиппокампе становился выше его значений в коре ГМ, несмотря на отсутствие статистически значимых изменений по отношению к контролю. С другой стороны концентрации целого ряда соединений (в том числе аргинина, треонина, АРУЦ, тирозина, α -АВА, α -ААА, лизина и триптофана) изменялись синхронно в обоих отделах. Снижению концентрации таурина в коре ГМ при введении L-NAME сопутствовало появление отрицательной корреляции между уровнями таурина в гиппокампе и коре ГМ ($r = -0,82$ против $-0,14$ и $-0,26$ в контроле и при СИГМ). Это может свидетельствовать о перераспределении пулов таурина между этими отделами.

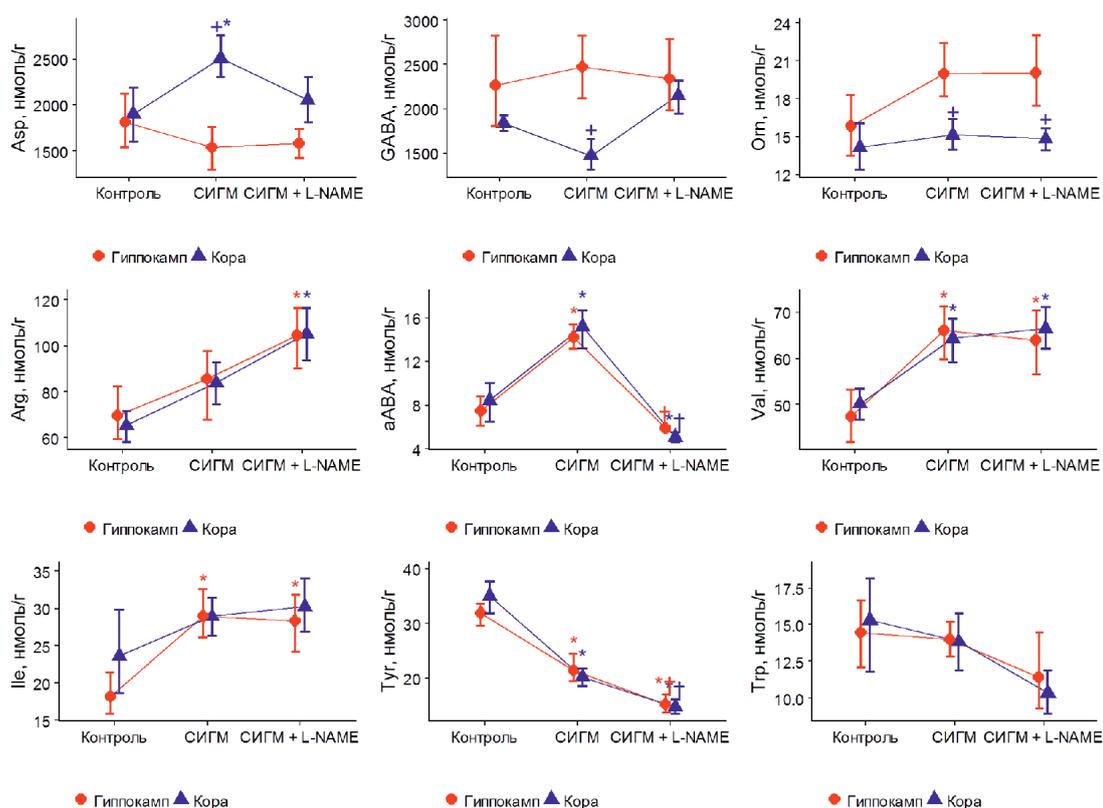


Рисунок 5 — Сравнение изменений некоторых показателей АК фонда гиппокампа и коры ГМ кыс при субтотальной ишемии ГМ и введения на ее фоне L-NAME, нмоль/г.

Примечание. Представлены средние значения с 95 % доверительным интервалом;

* — $p < 0,05$ при сравнении с контролем; † — $p < 0,05$ при сравнении с СИГМ; + — $p < 0,05$ при между отделами ГМ.

Наиболее значимыми показателями в дискриминации групп являлись: в коре — тирозин, треонин, глутамат, гистидин, триптофан и аргинин (F -искл. > 10), в гиппокампе — треонин, тирозин и лейцин (F -искл. = 30,3; 11,9 и 3,79 соответственно). При этом наборе предикторов достигалась высокодостоверная дискриминация между группами (Лямбда Уилкса = 0,00047 (кора) и 0,012 (гиппокамп), $F = 75,2$ и 35,3 соответственно, $p < 10^{-10}$).

Выводы. 1. Субтотальная ишемия головного мозга крыс индуцирует повышение в коре ГМ уровней аспартата, β -аланина, АРУЦ и снижение — глутамата, аспарагина, треонина, ГАМК, тирозина и 5-оксииндолацетата, в гиппокампе — нарушает уровни фенилаланина, гистидина, глутамина, тирозина, АРУЦ, а также активность серотониновой и дофаминовой систем.

2. Влияние СИГМ на пул свободных АК и нейроактивных соединений в исследуемых отделах ГМ крыс в основном одинаковое, однако имеется группа соединений, в том числе аспарат, орнитин и ГАМК, для которых характер влияния специфичен для гиппокампа и коры ГМ.

3. Предварительное введение L-NAME частично нормализует в коре и гиппокампе ГМ нарушения, вызываемые СИГМ, параллельно индуцирует аминокислотный дисбаланс, затрагивающий уровни ААК, аргинана, гистидина, треонина и таурина.

Список литературы

1. Влияние композиции аминокислот с разветвленной углеводородной цепью, триптофана и таурина на обмен аминокислот в экспериментальных моделях алкоголизма / В.Ю. Смирнов [и др.] // Украинский биохимический журнал. — 2003. — Т. 75, № 4. — С.101–107.

2. Изменения обмена ГАМК, глутамата и других нейроактивных аминокислот в разные сроки экспериментальной ишемии головного мозга. / Н.П. Канунникова [и др.] // Вестник ГрГУ. — 2006. — № 3. — С. 102–106.

3. Содержание аминокислот и их производных в коре головного мозга крыс при его частичной ишемии / Ю.Е. Разводовский [и др.] // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. — 2019. — Т. 18, № 1. — С. 5–9.

4. Levels of Free Amino Acids and their Derivatives in the Brain Cortex of Rats during Unilateral Ischemia / Y.E. Razvodovsky [et al.] // Intern. J. Neuroscience and Behavior. — 2017. — Vol. 1, № 1. — P. 18–21.

5. Maksimovich, N.Ye. Tolerance of hypoxic hypoxia in rats with cerebral ischemia treated by NO-synthase modulators / N.Ye. Maksimovich // Hypoxia medical. — 2004. — V. 1–2. — P. 20–23.

6. Razvodovsky, Y.E. Alcohol attributable fraction of stroke mortality in Russia / Y.E. Razvodovsky // J. Neurolog. Sci. — 2013. — Vol. 33, № 1. — P. 231.

7. Ryosuke, M.D. Effect of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia / M.D. Ryosuke // J. Anesthesiology. — 2002. — Vol. 96. — P. 705–710.

8. Substantial regional and hemispheric differences in brain nitric oxide synthase (NOS) inhibition following intracerebroventricular administration of N-nitro-L-arginine (L-NA) and its methyl ester (L-NAME) / M. Salter [et al.] // J. Neuropharmacology. — 1995. — № 34. — P. 639–649.

EFFECT OF L-NAME ON THE SPECTRUM OF AMINO ACIDS AND BIOGENIC AMINES IN THE HIPPOCAMPUS AND BRAIN CORTEX DURING SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA

Smirnov V.Y.¹, Razvodovsky Y.E.², Doroshenko E.M.¹, Maksimovich N.Ye.¹

*¹Grodno State Medical University,
Grodno, Republic of Belarus;*

*²Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The aim of this study was to estimate the changes in the pool of free amino acids and biogenic amines in the hippocampus and brain cortex of rats underwent subtotal cerebral ischemia (SCI) and treated with L-NAME. The subtotal cerebral ischemia induced imbalance in the pool of amino acids and their derivatives in the hippocampus and brain cortex. Preventive administration of L-NAME partially hindered this imbalance, but, however, induced changes in the levels of brain chain amino acids (BCAA), arginine, glistidine, treonine and taurine.*

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КАРБОНИЛСОДЕРЖАЩИХ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ ТИАМИНА, ОБРАЗОВАННЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И МЕТМИОГЛОБИНА

Степура И.И.¹, Агейко С.А.¹, Степура В.И.², Янецвич А.В.³

*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений*

Национальной академии наук Беларуси»,

г. Гродно, Республика Беларусь;

²*Учреждение образования «Гродненский государственный университет им. Янки Купалы»,*

г. Гродно, Республика Беларусь;

³*Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии*

Национальной академии наук Беларуси»

г. Минск, Республика Беларусь

Резюме. Тиамин, предшественник кофактора тиамин-зависимых ферментов, является высоколабильным соединением и способен претерпевать окислительные превращения. Методами масс-спектрологии показано, что оксоферрильные формы миоглобина окисляют тиамин с образованием тиохрома, оксодигидротиохрома и небольших количеств тиамин-дисульфида. Методами спектрофотометрии и ИК-спектрологии установлено наличие в составе оксодигидротиохрома карбонильной группы, легко реагирующей с водой или спиртами с образованием полуацеталей. Спектральные данные свидетельствуют, что в кислой среде происходит трансформация оксодигидротиохрома в 3'-оксотиамин — аналог молекулы тиамин с карбонильной группой на атоме углерода метиленового мостика, соединяющего пиримидиновый и тиазоловый циклы. Обсуждается возможная роль карбонильных производных тиамин в ингибировании тиамин-зависимых ферментов.

Введение. Тиаминдифосфат (TDP) является кофактором таких важнейших ферментов энергетического метаболизма, как пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа. Под действием пируватдегидрогеназы происходит окислительное декарбоксилирование пирувата, который образуется из глюкозы в цикле Эмбдена – Меерхофа. TDP также является кофактором транскетолазы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла. Кроме TDP в тканях организма всегда присутствуют некоферментные производные тиамин. Соотношение тиамин (Т) и его фосфорных эфиров составляет обычно следующие величины: (Т) 10–12 %, тиаминмонофосфат (TMP) 10–15 %, TDP 70–75 %, тиаминтрифосфат (TTP) 2–3 % [32]. Тиамин является лабильным соединением, способным претерпевать окислительные превращения при физиологических условиях. В тканях животных и человека, кроме фосфатов тиамин, постоянно присутствуют тиаминдисульфид (TSST) тиохром (TChr) и соответствующие фосфаты [27, 32].

Свободный Т и его фосфорные эфиры TMP, TTP выполняют также и собственные некоферментные функции, играют важную структурную роль, взаимодействуют с клеточными мембранами и увеличивают их стабильность [3].

Как известно, Т и TTP участвуют в передаче нервных импульсов, регулируют проницаемость Na^+ -каналов в нервной ткани [10, 26, 28]. Кроме того, Т не только улучшает метаболические процессы в мозгу у пациентов с болезнью Альцгеймера [5], а также с синдромом

Вернике – Корсакова [3, 7], но и снижают повреждения клеточных структур [4], выступают в качестве антиоксидантов, например, в нервной ткани, снижая ее повреждение при окислительном стрессе [8, 9]. Повреждение нервной ткани на фоне дефицита Т сопровождается усилением синтеза оксида азота, протеканием реакций нитрования тирозина с образованием 3-нитротирозина [17, 16].

В последние десятилетия, наряду с выяснением механизмов основных реакций, в которых каталитическую роль играет TDP, стали накапливаться данные о высокой биологической активности некоферментных метаболитов Т. Показано, что тиольная форма тиамин освобождает из состава S-нитрозоглутатионамоноксид азота, который вызывает релаксацию сосудов [39].

Тиамин уменьшает повреждение нейронов при окислительном стрессе. Кроме того, Т (особенно бенфотиамин) предотвращает повреждение сосудов при сахарном диабете, предупреждает развитие нефропатий, снижает уровень токсических продуктов неэнзиматического гликозилирования белков [6].

Защитные свойства Т нельзя объяснить только его коферментными свойствами, т. е. влиянием на метаболизм α -кетокислот, карбонильных соединений. Действительно, Т и его фосфорные эфиры ингибируют образование конечных продуктов гликозилирования белков также в опытах *in vitro*. В этом случае ингибирование неэнзиматического гликозилирования белков Т происходит в отсутствие ферментов [41].

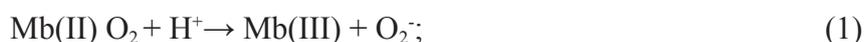
Одним из возможных механизмов защитного действия Т является его взаимодействие с пероксинитритом. Пероксинитрит очень эффективно нитрует остатки тирозина в различных ферментах и таким образом инактивирует их [25, 26].

Тиамин взаимодействует с пероксинитритом и разрушает его, что приводит к ингибированию реакции нитрования тирозинильных остатков белков [41].

Ранее показано, что Т под действием метмиоглобина и пероксида водорода окисляется с образованием TChr и ODTChr [33, 40].

Миоглобин является цитозольным белком, который содержится в высоких концентрациях в скелетных и сердечных мышцах. Концентрация миоглобина, например, в сердце составляет величину порядка 0,2–0,3 мМ [30]. Миоглобин представляет собой мономерный белок, который содержит одну полипептидную цепь и один гем. Как известно, миоглобин в кардиомиоцитах способен аутоокисляться с образованием супероксиданионов и пероксида водорода [37, 43, 44].

Схематически этот процесс аутоокисления оксимииоглобина можно представить следующими уравнениями:



После смешивания метмиоглобина с пероксидом водорода наблюдали образование оксоферрильных форм миоглобина: $^*\text{Mb(IV} = \text{O)}$ (соединение I) и $\text{Mb(IV} = \text{O)}$ (соединение II), которые легко регистрируются спектрофотометрически.

При нормальных физиологических условиях эти аутоокислительные реакции очень медленны и протекают с низкой скоростью. Однако если кардиомиоциты функционируют в условиях ишемии (низкое значение рН, низкое давление кислорода в тканях), то резко возрастает образование активных форм кислорода и оксоферрильных форм миоглобина [19, 29].

Изучение механизма этих реакций представляет большой интерес, так как оксоферрильные формы миоглобина, вероятно, могут вызвать быстрое снижение концентрации (Т) в кардиомиоцитах при окислительном стрессе, вследствие трансформации в окисленные продукты, например, TChr, ODTChr [23, 33, 40].

При обсуждении возможных механизмов защитного действия Т рассматривались его реакции с пероксинитритом — сильным окислителем, который эффективно нитрует остатки тирозина в различных ферментах, приводя к их инактивации [25, 26]. Высокие концентрации Т способны ингибировать нитрование тирозинильных остатков белков пероксинитритом, и в процессе окислительной трансформации Т образуются тиохром (TChr) и оксодигидроотиохром (ODTChr), которые являются более эффективными скэвенджерами пероксинитрита, нежели Т [41]. Подобные окислительные трансформации Т с образованием TChr и ODTChr наблюдались и в присутствии метмиоглобина и H_2O_2 [33, 40].

С другой стороны, реакции с такими сильными окислителями как пероксинитрит или оксоферрильные формы гем-содержащих белков могут не только снижать уровень Т в тканях, но и приводить к образованию продуктов окислительной модификации Т способных выступать в качестве конкурентных ингибиторов тиамин-зависимых ферментов. Например, 2-оксотиамииндифосфат (2-охо-TDP) — аналог TDP с карбонильной группой во 2-положении тиазолового цикла — связывается с пируватдегидрогеназой примерно в 20 000 раз сильнее, чем TDP и конкурентно ингибирует данный фермент [21]. В то время как негативный эффект снижения уровня Т в тканях может корректироваться приемом повышенных концентраций Т, влияние ингибиторов скорректировать значительно труднее.

В данной работе мы исследовали строение продуктов окисления тиамин, а также кислотно-щелочные превращения ODTChr, протекающие с образованием карбонильных производных тиамин, вероятно, способных выступать в качестве ингибиторов тиамин зависимых ферментов. Исследование проводили спектрально-флуоресцентными методами, а также методами масс- и ИК-спектроскопии.

Материалы и методы исследования. В работе использовали тиамин, тиохром и миоглобин из сердца лошади (фирма *Sigma*, США). ODTChr получали по описанному ранее методу [42]. Продукты окислительной трансформации тиамин, полученные после инкубации тиамин с метмиоглобином в присутствии пероксида водорода, разделяли на индивидуальные соединения методом гельфильтрации на сефадексе G-50 [33], а также на хроматографе Agilent-1100, сорбент Zorbax-extend-C18. Масс-спектры тиамин и его производных зарегистрированы с использованием квадрупольно-времяпролетного tandemного масс-спектрометрического детектора Q-TOF 6550 в режиме ионизации электрораспылением (ESI).

Спектры поглощения в УФ и видимой областях записывали на спектрофотометре Спекорд М40, спектры флуоресценции измеряли с помощью спектрофлуориметра SFL 1211a (Беларусь). ИК спектры регистрировали на FTIR спектрометре Tensor 27 (Брукер, Германия).

Результаты исследования и их обсуждение. В Т пиримидиновый и тиазоловый компоненты соединены между собой метиленовым мостиком и фактически сопряженные системы компонентов изолированы друг от друга. Кроме того, сами плоскости циклов, по данным рентгеноструктурного анализа, расположены в кристаллах под углом близким к 90° [34] и, вероятно, эффект сопряжения их электронных систем в растворе также незначителен. Т в нейтральной и кислой водных средах стабилен, а в щелочной области образует тиольную форму с раскрытым тиазоловым циклом, а также в небольших количествах трициклическую форму [31]. Тиольная форма тиамин окисляется под действием феррицианида или пероксида водорода в дисульфид

тиамина (TSST), а трициклическая форма тиамина в TChr. TSST и TChr не испытывают дальнейших превращений под действием феррицианида.

Однако в случае других окислителей, например, пероксинитрита, TChr не является конечным продуктом окисления Т. Под действием пероксинитрита TChr первоначально окисляется с образованием ODTChr (м.в. по данным масс-спектрологии составляет 278,812), который, затем под действием пероксинитрита превращается в продукты, поглощающие при 295 нм [41].

Миоглобин — это гемсодержащий белок, обратимо связывающий молекулярный кислород. Миоглобин запасает кислород в мышцах. В дополнение к своей главной функции миоглобин катализирует различные редокс реакции, связанные со стадиями одно- или двухэлектронного переноса [12, 13, 14, 20, 23, 33, 35, 36, 38].

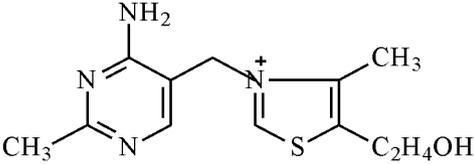
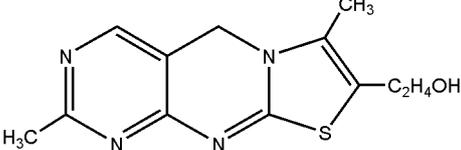
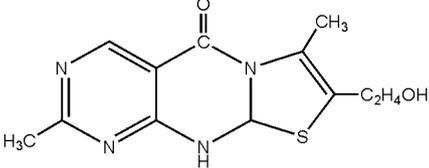
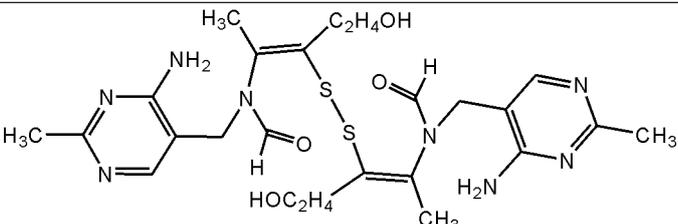
Метмиоглобин катализирует окисление Т в присутствии H_2O_2 .

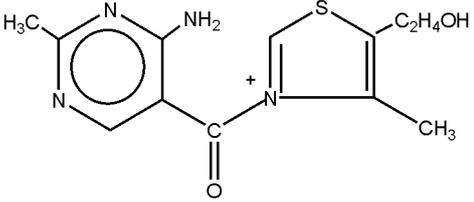
После инкубации Т с метмиоглобином и H_2O_2 масс-спектр растворов содержит, кроме молекулярного иона Т ($m/z = 265,111$), также молекулярные ионы TChr ($m/z = 262,088$), ODTChr ($m/z = 278,086$) и TSST ($m/z = 562,216$) (табл. 1). Структурные формулы Т, продуктов окислительной трансформации Т и величины m/z их молекулярных ионов приведены в табл. 2.

Таблица 1 — Значения m/z и интенсивность пиков в масс-спектрах продуктов окислительной трансформации Т, образовавшиеся в водных растворах тиамина после его инкубации с Mb(III) и H_2O_2

Состав инкубационной смеси	Т $m/z = 265,111$	TChr $m/z = 262,088$	ODTChr $m/z = 278,086$	TSST $m/z = 563,223$
Mb(III) + Т (1мМ) + H_2O_2	240780	241780	66443	200
Mb(III) + TChr (0,5 мМ) + H_2O_2	—	5184	500021	—

Таблица 2 — Структурные формулы тиамина, продуктов окислительной трансформации тиамина и величины m/z их молекулярных ионов

Структурная формула	Наименование вещества и величины m/z их молекулярных ионов
	Тиамин (Т) $m/z = 265,111 [M]^+$ $m/z = 266,1144 [M+H]^+$
	Тиохром (TChr) $m/z = 262,0882 [M]^+$ $m/z = 263,0938 [M+H]^+$ $m/z = 264,0968 [M+H]^+$
	Оксидигидроотиохром (ODTChr) $m/z = 278,812[M]^+$ $m/z = 279,0885[M+H]^+$ $m/z = 280,0936 [M+H]^+$ $m/z = 281,0891[M+H]^+$
	Тиаминдисульфид (TSST) $m/z = 562,012 [M]^+$ $m/z = 563,22 [M+H]^+$

Структурная формула	Наименование вещества и величины m/z их молекулярных ионов
	3-оксо-тиамин (3-охо-Т) m/z = 279,11 [M] ⁺

Продукты окисления тиамин ТChr и ODTChr выходят в составе фракции с $R_T = 2,90$ и $R_T = 3,00$ и составляют основную массу окисленных продуктов Т. В составе этих фракций элюируется в следовых количествах TSST.

Это связано с тем, что при pH 7,0 или ниже, в водном растворе Т находится в циклической форме, а концентрация тиольной формы тиамин в этих условиях не превышает 2 % от общей концентрации Т в растворе. Данные масс-спектрологии свидетельствуют, что ТChr под действием оксоферрильных форм миоглобина окисляется с образованием ODTChr.

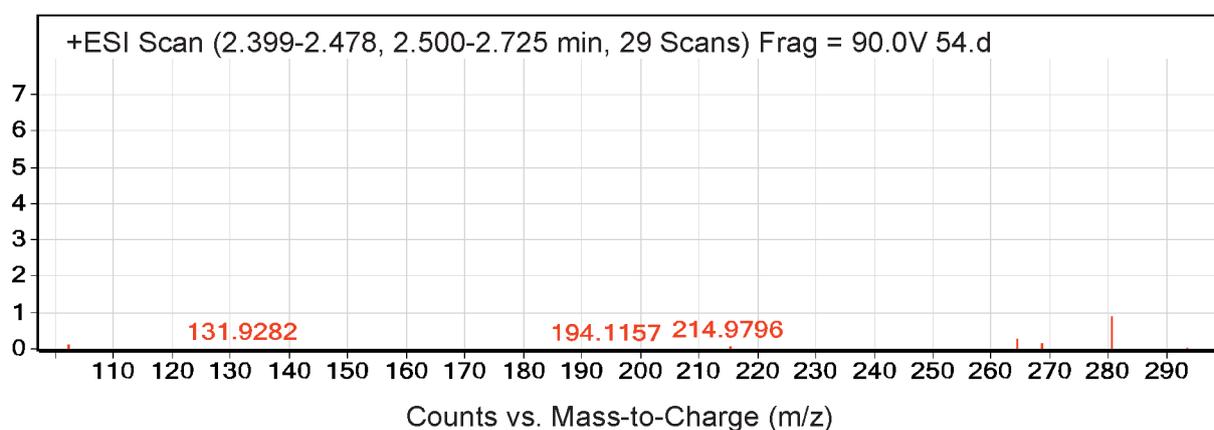


Рисунок 1 — Масс-спектр продуктов окисления ТChr, образовавшихся после инкубации ТChr с 10 мкМ метмиоглобином и 1,0 мМ H₂O₂

Пик с m/z = 263,093 принадлежит молекулярному иону ТChr ([M+H]⁺), пик m/z = 279,088 принадлежит молекулярному иону ODTChr ([M+H]⁺).
Начальная концентрация ТChr в растворе 0,5 мМ

Масс-спектр ТChr содержит один интенсивный пик, принадлежащий молекулярному иону с m/z = 262,097. После инкубации водного раствора ТChr с метмиоглобином и H₂O₂ в течение 24 часов наблюдали окисление ТChr в продукт с m/z = 279,0886 ([M+H]⁺), который является ODTChr (рис. 1).

Спектры поглощения Т и продуктов его окислительной трансформации, полученные после инкубации Т в присутствии миоглобина и H₂O₂ и последующего разделения смеси на индивидуальные соединения методом гелифльтрации на сефадексе G-50, приведены на рис. 2.

Для ТChr и ODTChr характерно сопряжение π-электронных систем аминопиримидинового и тиазолового циклов, что сказывается на положении полосы поглощения в более длинноволновой области, чем для тиамин. Следовательно, можно говорить о планарности структуры ODTChr. Изменение молекулярной массы при переходе от ТChr к ODTChr составляет ~ 16 Да, что дает основание полагать о включении атома кислорода в структуру молекулы. Однако

в ИК-спектре поглощения ODTChr отсутствует полоса в области, характерной для валентных колебаний карбонильной группы. Для идентификации характеристических частот колебаний функциональных групп в молекуле оксидигидротиохрома использовали производные Т с заместителями в 5-β-оксиэтильном остатке тиазолового цикла (табл. 3).

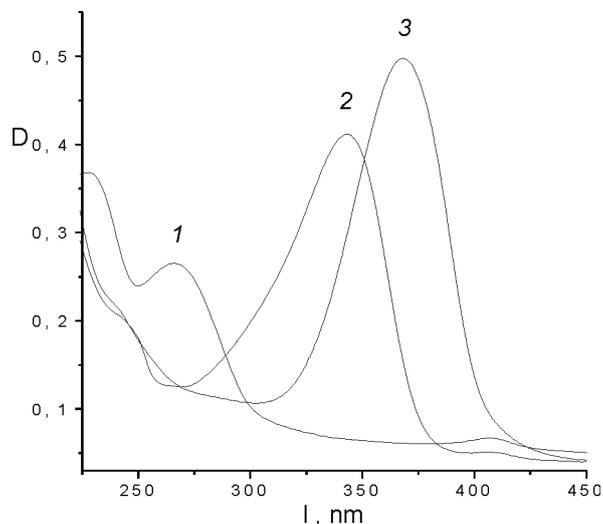


Рисунок 2 — Спектры поглощения Т (1), ODTChr (2), TChr (3)

Таблица 3 — Структурные формулы тиамин и его производных

Структурная формула	Название соединения
<chem>Cc1nc(N)nc(CSC1=N)cn1</chem>	Тиамин (Т)
<chem>Cc1nc(N)nc(CSC1=N)cn1</chem>	Дезоксиметилтиамин (ДОМТ)
<chem>Cc1nc(N)nc(CSC1=N)cn1</chem>	Дезокситиамин (ДОТ)
<chem>Cc1nc(N)nc(CSC1=N)cn1</chem>	Хлортиамин
<chem>Cc1nc(N)nc(CSC1=N)cn1</chem>	Этилен-тиамин

Сравнение ИК-спектров поглощения Т и производных Т с различными заместителями в 5-β-оксиэтильном остатке тиазолового цикла позволяет идентифицировать полосу валентных колебаний С-О группы (табл. 4). В области валентных колебаний С-О группы, которая в спектре поглощения TChr лежит при 1074 см⁻¹, в ИК-спектре ODTChr появляется новая уширенная интенсивная полоса при 1020 см⁻¹ (табл. 5). В спектре поглощения ODTChr в области деформационных колебаний СН₂-групп исчезает, полоса 1330 см⁻¹, которая присутствовала как в спек-

тре TChr, так и в спектре T или производных T. Поэтому эта полоса наиболее вероятно принадлежит к деформационным колебаниям CH₂-группы метиленового мостика. В области валентных колебаний OH-групп наблюдается уширение полос по сравнению с T и TChr и длинноволновый сдвиг и возрастание интенсивности поглощения. Это также свидетельствует об увеличении содержания OH групп в составе молекулы ODTChr (рис. 3). В ИК-спектре ODTChr в хлороформе регистрируется полоса колебаний карбонильной группы.

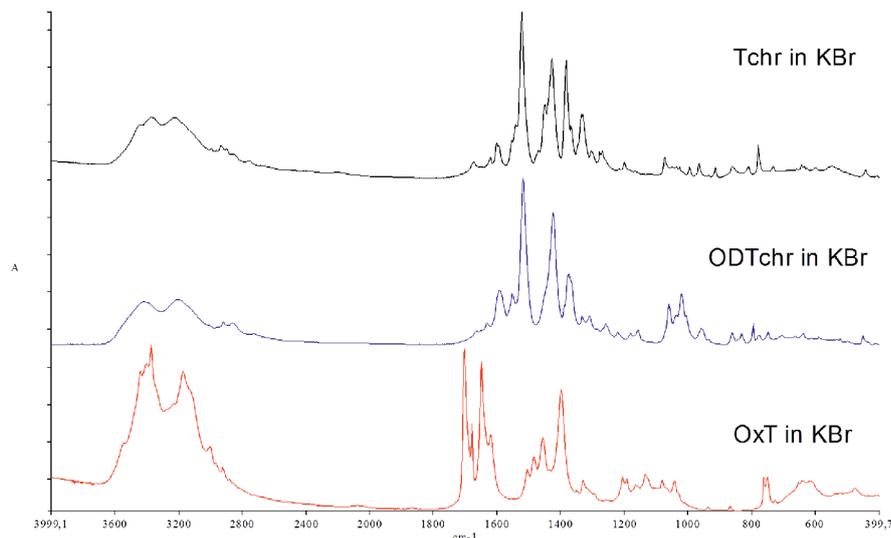


Рисунок 3 — ИК-спектры поглощения (TChr)- (1), (ODTChr)- (2) и 3-охо- T- (3)

Таблица 4 — Частоты характеристических колебаний C-OH группы T и его производных в KBr

Тиамин хлорид гидрохлорид, (см ⁻¹)	Дезокситиамин бромид гидробромид, (см ⁻¹)	Хлоротиамин хлорид гидрохлорид, (см ⁻¹)	Дезокси-метилтиамин, (см ⁻¹)	Этилен-тиамин, (см ⁻¹)	Отнесение полос к колебаниям функциональной группы
3510 3445	—	—	—	3515 3450	ОН валентное
3400 сл. широкая	—	3420	—		ОН валентное, гидратной воды
1050	—	—	—	1060	C—O валентное

Анализ спектров поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях для TChr и ODTChr, а также их ИК-спектров позволяет заключить, что карбонильная группа ODTChr в водных растворах и в конденсированном состоянии гидратирована. Предполагаемая схема протекания реакции гидратации ODTChr приведена на рис. 4.

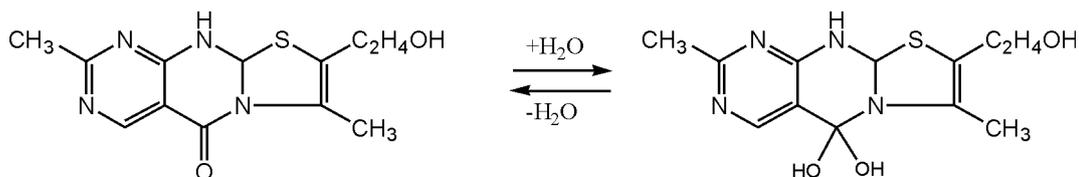


Рисунок 4 — Реакция гидратации ODTChr

Обнаружено, что ODTChr в воде имеет максимум поглощения при 340 нм. В хлороформе полоса поглощения смещается в коротковолновую область с максимумом при 314 нм и плечом

поглощения при 340 нм. Добавление этанола к раствору ODTChr в хлороформе приводит к росту поглощения в длинноволновой области при 340 нм, а интенсивность полосы поглощения с максимумом при 314 снижается (рис. 5). Это связано с образованием полуацеталей, вследствие взаимодействия молекул этилового спирта с карбонильной группой молекулы ODTChr.

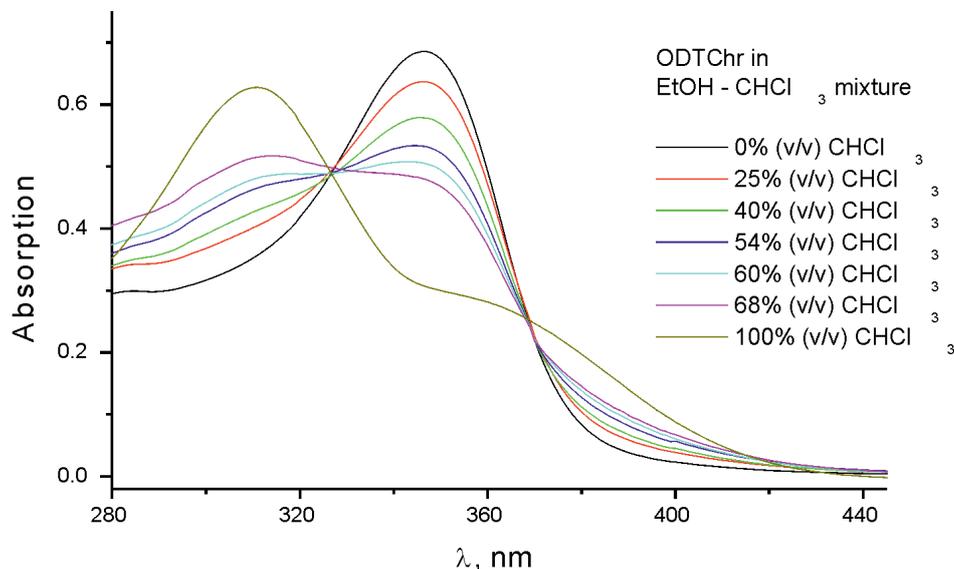


Рисунок 5 — Спектры поглощения ODTChr в бинарных смесях EtOH-CHCl₃

TChr характеризуется кислотно-щелочным переходом с $pK_a = 4,9$. Спектр поглощения TChr в нейтральной и щелочной средах содержит длинноволновую полосу с максимумом 365 нм, в кислой — с максимумом при 390 нм. TChr стабилен как в кислой, так и в щелочной средах. ODTChr характеризуется кислотно-щелочными переходами с $pK_a = 10,7$ и $pK_a = 4,5$. В сильнокислой среде (рН 3,0 и ниже) наблюдали постепенное превращение ODTChr в новое соединение — 3-оксотиамин (3-охо-Т).

В ИК-спектре в KBr появляется карбонильная полоса при 1700 см^{-1} , отсутствующая в спектре исходного ODTChr (см. рис. 3).

На рис. 6 представлены УФ-спектры поглощения 3-охо-Т в нейтральной и кислой средах. Как видно из рис. 2 и 6, спектр 3-охо-Т также как и спектр Т имеет два максимума поглощения, но только смещенные в более длинноволновую область 250 нм и 300 нм. Это свидетельствует о разрушении трициклической структуры молекулы ODTChr и нарушении сопряженной системы молекулы. Для Т соответствующие максимумы поглощения лежат при 233 нм и 267 нм (см. рис. 2).

Таблица 5 — Частоты характеристических полос колебаний С-О групп тиамин, тиохрома и оксидигидро тиохрома в KBr и хлороформе

Тиамин хлорид гидрохлорид в KBr (см^{-1})	TChr в KBr (см^{-1})	ODTChr в KBr (см^{-1})	ODTChr в хлороформе (см^{-1})	Отнесение полос к колебаниям функц. группы
1050	1074	1060 1020 (два плеча при 1039 и 1005)	1045 (плечо при 1060)	С-О валентное

3-охо-Т является аналогом Т, имеющим неизмененные пиримидиновый и тиазоловый циклы, содержащим карбонильную группу на атоме углерода метиленового мостика, соединяюще-

го пиримидиновый и тиазоловый компоненты. В щелочной среде (рН больше 9,0) для 3-охо-Т, как и для Т наблюдается образование тиольной формы с раскрытым тиазоловым циклом. В то же время 3-охо-Т в отличие от Т в щелочной среде не окисляется феррицианидом обратно в ODTChr. Мы предполагаем, что это связано с особенностями структуры 3-охо-Т. Образование внутримолекулярной водородной связи между аминогруппой пиримидинового компонента и карбонильной группой в молекуле 3-охо-Т приводит к повороту плоскости тиазольного кольца и удалению его 2-го атома углерода от аминогруппы пиримидина (рис. 7, III).

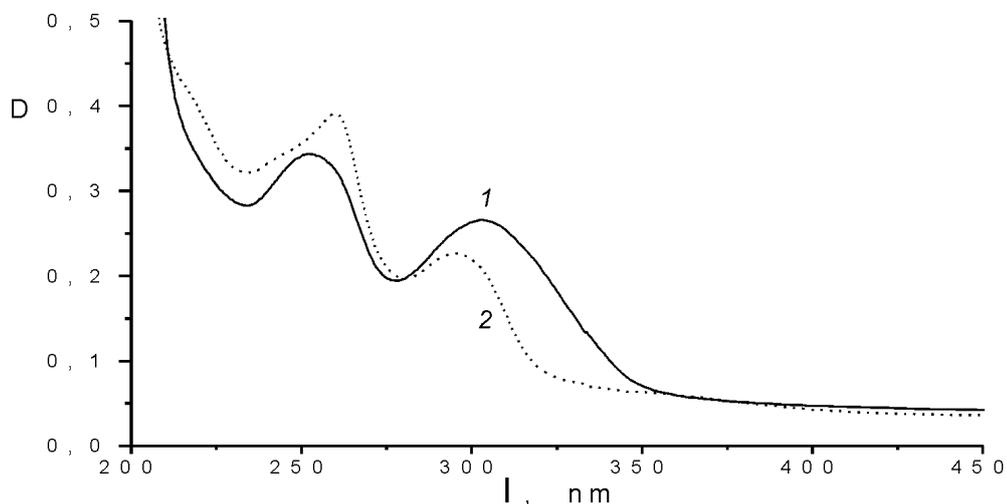


Рисунок 6 — Спектры поглощения 3-охо-Т в нейтральной среде рН = 7,0 (1) и кислой среде рН = 3,0 (2)

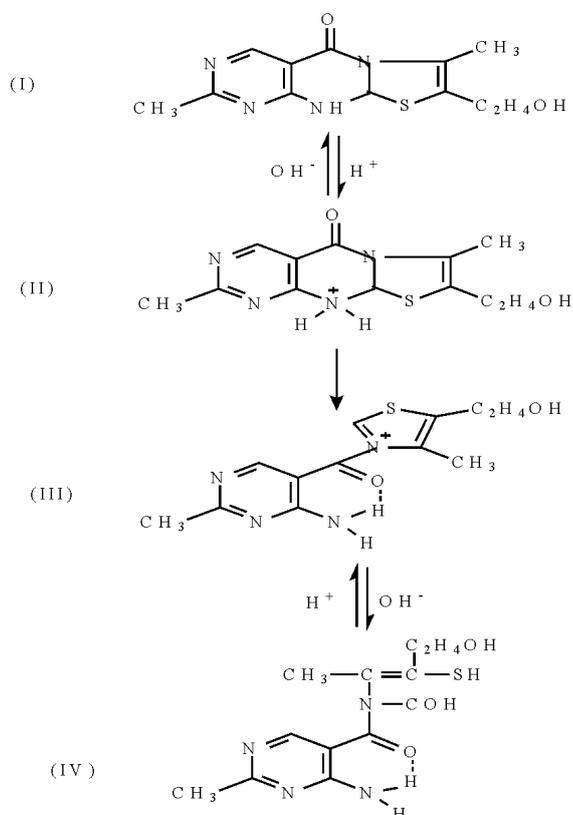


Рисунок 7 — Предполагаемая схема кислотно-щелочных превращений ODTChr: I — ODTChr в нейтральной среде; II — протонированная форма ODTChr, III — 3-охо-Т; IV — тиольная форма 3-охо-Т

Результаты многочисленных исследований показали, что при взаимодействии H_2O_2 с гемопротейнами, в том числе с миоглобинами и гемоглобинами, формируются высокореакционные оксоферрильные формы гемопротейнов, например, для миоглобина это $^{+}Mb(IV=O)$ или соединение I и $Mb(IV=O)$, или соединение II, которые окисляют многие биомолекулы и инициируют перекисное окисление липидов [1, 12, 13, 14, 20, 22, 35, 36, 38].

H_2O_2 образуется в организме, как вследствие прямой неэнзиматической реакции дисмутации супероксидов, так и вследствие реакции катализируемой СОД, а также генерируется аминоксидазой и глюкозооксидазой. Кроме того, постоянно образуют H_2O_2 макрофаги, клетки эндотелия. Перекисное окисление липидов сопровождается образованием органических пероксидов. Следует отметить, что оксоферрильные формы гемопротейнов могут образовываться не только в реакциях с пероксидами, но и при взаимодействии с пероксинитритом [15].

Стационарная концентрация H_2O_2 в крови при нормальных условиях, вследствие разрушения каталазой и глутатионпероксидазой, не превышает 0,2 нМ [18]. Однако даже под действием этой низкой концентрации H_2O_2 метгемоглобин (или гемоглобин) постоянно окисляется с образованием феррильной формы гемоглобина с радикалом, локализованным на белковой глобуле. Обе оксоферрильные формы гемоглобина — соединение I ($^{+}Mb(IV=O)$) и соединение II ($Mb(IV=O)$) были обнаружены в крови при физиологических условиях [45].

Концентрация H_2O_2 в крови и тканях сильно возрастает при патологических состояниях, например, при ишемии-реперфузии и может достигать 10 мкМ и выше в сердечной мышце при ишемии.

В данной работе спектрально-флуоресцентными методами, а также методами масс-спектропии показано, что после инкубации Т с миоглобином и H_2O_2 в водном растворе образуются TChr, ODTChr и небольшие количества TSST (см. рис. 1 и 2, табл. 1 и 2).

Образование ODTChr протекает через стадию окисления TChr (см. рис. 1, табл. 1). Суммируя полученные результаты можно заключить, что молекула Т в результате двухэлектронного окисления превращается в TChr, а оксоферрильная форма $^{+}Mb(IV=O)$ (соединение 1) при этом восстанавливается до ферри-формы Mb(III). Мы предполагаем, что первоначально молекула Т в результате одноэлектронного окисления превращается в трициклический катион-радикал, а макромолекула $^{+}Mb(IV=O)$ при этом восстанавливается до $Mb(IV)=O$. На втором этапе реакции происходит перенос протона на $Mb(IV)=O$ и образуется $Mb(IV)-OH$. Затем происходит присоединение гидроксильного радикала к катион-радикалу Т и образование TChr. В свою очередь $Mb(IV)-OH$ восстанавливается до $Mb(III)$ (рис. 8).

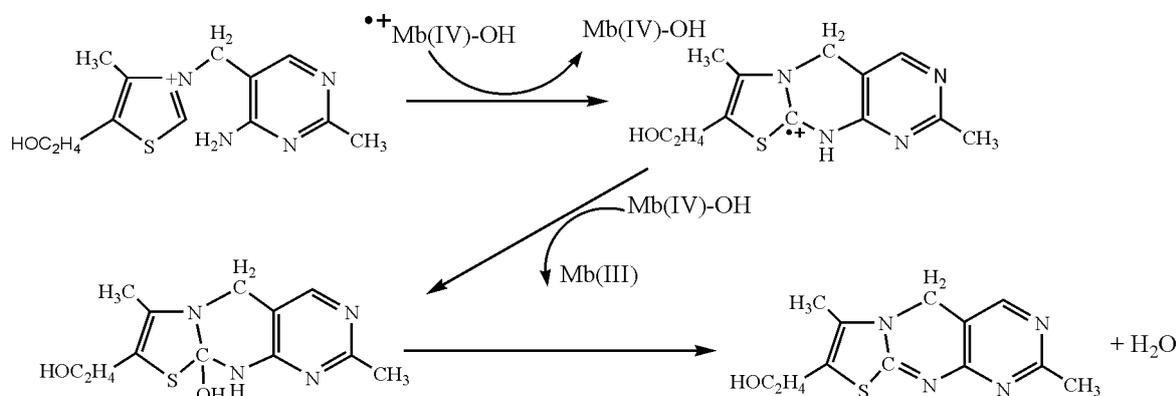


Рисунок 8 — Предполагаемая схема окисления Т в TChr в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином. Состав инкубационной смеси, метмиоглобин, Т и H_2O_2

TChg под действием новой молекулы $^{+}Mb(IV) = O$ окисляется до катион-радикала TChg, который после присоединения гидроксильного радикала по атому углерода метиленового мостика и внутримолекулярной перегруппировки образует оксодигидротиохром (рис. 9). Оксоферрильная форма $^{+}Mb(IV = O)$ (соединение 1) при этом восстанавливается до ферри-формы Mb(III).

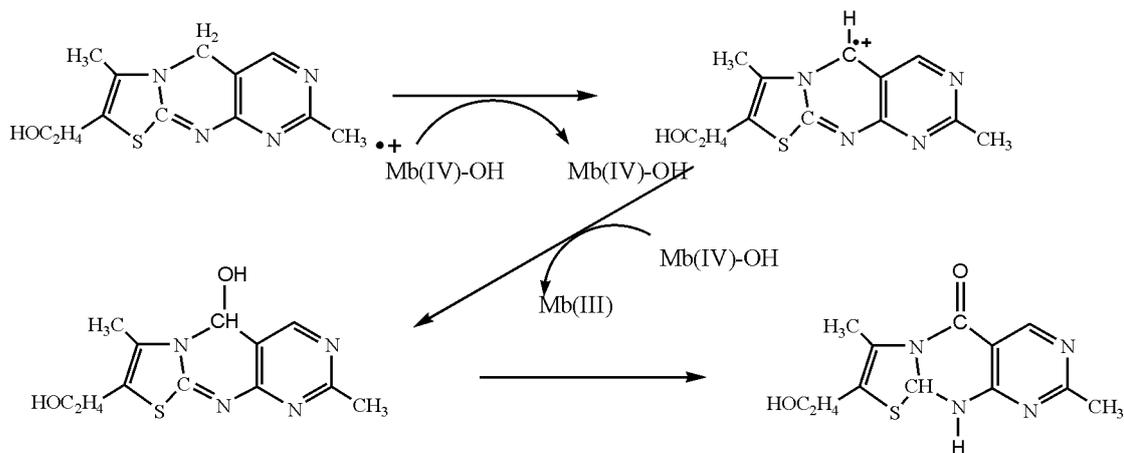


Рисунок 9 — Предполагаемая схема окисления TChg в ODTChg в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином

Для ODTChg наблюдается длинноволновый сдвиг полосы поглощения и усиление интенсивности поглощения в абсорбционном электронном спектре (см. рис. 2), что вероятно, связано с увеличением сопряжения π -электронных систем аминопиримидинового и тиазолового циклов и может свидетельствовать о планарной структуре молекулы ODTChg.

Методом ИК-спектроскопии показано, что в состав молекулы ODTChg входит карбонильная группа. В водных растворах, а также в конденсированном состоянии наблюдается гидратация данной карбонильной группы молекулы ODTChg (см. рис. 3–5 табл. 4,5).

В кислой среде ODTChg превращается в 3-охо-Т — аналог тиамин, содержащий карбонильную группу на атоме углерода метиленового мостика, соединяющего неизменные пиримидиновый и тиазоловый циклы (рис. 7, табл. 2). Мы полагаем, что в этих условиях происходит образование внутримолекулярной водородной связи, между аминогруппой пиримидинового компонента и карбонильной группой в молекуле оксотиамина. В щелочной среде оксотиамин образует тиольную форму с раскрытым тиазоловым циклом ($pK = 10,7$) (см. рис. 5, IV).

Полученные результаты позволяют предположить, что при окислительном стрессе, когда резко возрастает уровень активных форм кислорода и возрастает содержание оксоферрильных форм гемопroteинов, усиливается катаболизм Т.

Снижение концентрации тиамин при окислительном стрессе может вызывать уменьшение суммарной активности тиамин-зависимых ферментов и вносить вклад в развитие патофизиологических процессов. Во-вторых, активность тиамин-зависимых ферментов, вероятно, может конкурентно ингибироваться образовавшимися карбонильными производными Т. Известно, что при гипоксических состояниях в тканях миокарда наблюдается понижение pH до 4,0–4,5, что может вызвать превращение оксодигидротиохрома в 3-охо-Т (см. соединение III, рис. 7). 3-охо-Т и 3-охо-TDP являются сходными по структуре аналогами молекул соответственно Т и TDP и могут конкурировать с ними за места связывания на макромолекуле апофермента.

Мы предполагаем, что 3-охо-Т, содержащий карбонильную группу на атоме углерода метиленового мостика, соединяющего неизменные пиримидиновый и тиазоловый циклы, может

вызывать ингибирование тиамин-зависимых ферментов энергетического метаболизма и способствовать повреждению или гибели клеточных структур организма. Ранее показано, что фосфорилированные производные Т, содержащие карбонильную группу на 2-м углеводе тиазолового кольца конкурируют с тиаминдифосфатом за места связывания с апоферментом [21]. В табл. 6 приведены структурные формулы 3-охо-Т, оху-Т, 2-охо-Т и их фосфорных эфиров.

Таблица 6 — Структурные формулы охо-Т и оху-Т и их фосфорных эфиров [2, 11, 24, 31]

Структурная формула	Название соединения
	2-оксотиамин (2-охо-Т)
	Окситиамин (оху-Т)
	3-оксотиамин (3-охо-Т)
	2-оксотиаминдифосфат (2-охо-TDP)
	Окситиаминдифосфат (оху-TDP)
	3-оксотиаминдифосфат (3-охо-TDP)

*Примечание: предполагаемый продукт фосфорилирования 3-охо-Т под действием тиаминкиназы.

2-Оксотиаминдифосфат (2-охо-TDP) связывается с пируватдегидрогеназой примерно в 20 000 раз сильнее, чем TDP и конкурентно ингибирует данный фермент [21]. 2-Оксо-TDP является аналогом промежуточных продуктов, образующихся в процессе декарбоксилирования пирувата в активном центре пируват-дегидрогеназного компонента мультиферментного комплекса. Серусодержащий цикл этого аналога не несет заряда, и, следовательно, очень сходен с промежуточным состоянием нормального кофермента в реакциях, катализируемых Т [2, 21, 31]. Окситиаминдифосфат (оху-TDP) содержит гидроксильную группу на пиримидиновом цикле и также ингибирует тиаминзависимые ферменты, например, транскетолазу [24]. Как показано ранее, производные Т с замещениями или видоизменениями тиазолового цикла всегда фосфо-

рилируются, если сохраняется гидроксильная группа 5-β-оксиэтильного остатка. Причем фосфорилирование происходит и в том случае, когда вместо тиазолового компонента используются соединения другой структуры. Например, пиритиамин, содержащий вместо тиазола, 2-метил-3-(2-оксиэтил)-пиридин [32].

Мы предполагаем, что фосфорилированные карбонильные продукты деградации Т, образованные при окислительном стрессе, в том числе 3-охо-Т — аналог тиамина, содержащий карбонильную группу на атоме углерода метиленового мостика, могут вызывать конкурентное ингибирование важнейших тиамин-зависимых ферментов энергетического метаболизма, что приводит к нарушению их физиологически-нормального функционирования.

Работа была поддержана грантом БРФФИ № М18–157, проектом ГПНИ «Химические технологии и материалы на 2016–2020 годы», подпрограмма «Фармакология и фармация», задание 5.28.

У авторов отсутствует конфликт интересов в финансовой и других сферах.

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Список литературы

1. Мецлер, Д. Химические реакции в живой клетке / Д. Мецлер // Биохимия. — М.: Мир, 1980. — Т. 2. — С. 207–209.
2. A cross-kingdom Nudix enzyme that pre-empts damage in thiamin metabolism / A. Goyer [et al.] // *J. Biochem.* — 2013. — Vol. 454, № 3. — P. 533–542.
3. Ba, A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues / A. Ba // *Cell Mol Neurobiol.* — 2008. — Vol. 28. — № 7. — P. 923–931.
4. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro / U. Schmid [et al.] // *J. Diabets metabolism Res. Rev.* — 2008. — Vol. 24, № 5. — P. 371–377.
5. Blass, J.P. Thiamine and Alzheimers disease: a pilot study / J.P. Blass, P. Gleason, D.Brush // *Archives of neurology.* — 1988. — Vol. 45, № 8. — P. 833–835.
6. Booth, A.A. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine / A.A. Booth, R.G. Khalifah, B.G. Hudson // *J. Biochem. Biophys. Res.* — 1996. — Vol. 220, № 1. — P. 113–119.
7. Brown, L.A. Chronic ethanol ingestion potentiated TNF-α-mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells / L.A. Brown, F.L. Harris, D.M. Guidot // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* — 2001. — Vol. 281, № 2. — P. 377–386.
8. Calingasan, N.Y. Vascular endothelium is a site of free radical production and inflammation in areas of neuronal loss in thiamine-deficient brain / N.Y. Calingasan, G.E. Gibson // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2000. — Vol. 903. — P. 353–356.
9. Changes in nitric oxide synthase — containing neurons in the brain of thiamine-deficient mice / H. Matsushita [et al.] // *Acta Histochem. Cytochem.* — 2000. — Vol. 33, № 2. — P. 67–72.
10. Cooper, J.R. The role of thiamine in nervous tissue / J.R. Cooper, J.H. Pincus // *Neurochem Res.* — 1979 — Vol. 4. — № 2. — P. 223–239.
11. Datta, A.G. Mechanism of action of transketolase I. Properties of the crystalline yeasts enzyme / A.G. Datta, E. Racker // *J. Biol. Chem.* — 1961. — Vol. 236, № 3. — P. 617–623.
12. Everse, J. Peroxidative activities of hemoglobin and hemoglobin derivatives / J. Everse, M. Johnson, M.A. Marini // *J. Acad. Press.* — 1994. — Vol. 231. — P. 547–561.
13. Everse, J. The toxicities of native and modified hemoglobins / J. Everse, N. Hsia // *J. Free Rad. Biol. Med.* — 1997. — Vol. 22, № 6. — P. 1075–1099.
14. Evidence for the Role of a Peroxidase Compound I-type Intermediate in the Oxidation of Glutathione, NADH, Ascorbate and Dichlorofluorescein by Cytochrome c/H2O2 Implications for

- oxidative stress during apoptosis / A. Lawrence [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278, № 32. — P. 29410–29419.
15. Exner, M. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin / M. Exner, S. Herold // *J. Chem. Res. Toxicol.* — 2000. — Vol. 13, №4. — P. 287–293.
16. Gibson, G.E. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration / G.E. Gibson, H. Zhang // *J. Neurochem. Internat.* — 2002. — Vol. 40, № 6. — P. 493–504.
17. Gibson, G.E. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration / G.E. Gibson, J.P. Blass // *J. Antioxid. Redox Signaling.* — 2007. — Vol. 9, № 10. — P. 1605–19.
18. Giulivi, C. Hydrogen peroxide-mediated ferrylhemoglobin generation in vitro and in red blood cells / C. Giulivi, J.A. Davies // *Methods in Enzymology.* — 1994. — Vol. 231. — P. 490–496.
19. Gunther, M. R. Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury / M.R. Gunther, V. Sampath, W.S. Caughey // *J. Free Rad. Biol. Med.* — 1999. — Vol. 26, № 11–12. — P. 1388–1395.
20. Gunther, R.M. Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin by hydrogen peroxide / R.M. Gunther // *J. Biochem.* — 1998. — Vol. 330, № 3. — P. 1293–1299.
21. Gutowski, J.A. Transition state analogs for thiamin pyrophosphate-dependent enzymes / J.A. Gutowski, E. Gustav Lienhard // *J. Biol. Chem.* — 1976. — Vol. 251, № 9. — P. 2863–2866.
22. Herold, S. Kinetic and mechanistic studies of the reactions of nitrogen Monoxide and nitrite with ferryl myoglobin / S. Herold, F-J.K. Rehman // *J. Biol. Inorg. Chem.* — 2001. — Vol. 6. — P. 543–555.
23. In the presence of phenol-containing compounds oxoferryl forms of myoglobin and hemoglobin catalyze oxidative transformation of thiamine and its derivatives / S.A. Labor [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series.* — 2017. — № 2. — P. 55–65.
24. Inhibition of the Escherichia coli Pyruvate Dehydrogenase Complex E1 Subunit and its Tyrosine 177 Variants by Thiamin 2-Thiazolone and Thiamin 2-Thiothiazolone Diphosphates evidence for reversible tight-binding inhibition / N. Nemeria [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276, № 49. — P. 45969–45978.
25. Ischiropoulos, H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration / H. Ischiropoulos // *J. Biochem. Biophys. Res. Communications.* — 2003. — Vol. 305, № 3. — P. 776–83.
26. Itokawa, Y. Thiamine in nerve membranes / Y. Itokawa, R.A. Schulz, J.R. Cooper // *J. BBA.* — 1972. — № 1. — P. 293–299.
27. Longdale, D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamine(e) and its derivatives / D. Longdale // *CAM.* — 2006. — № 3. — P. 49–59.
28. Matsuda, T. Thiamine as an integral components of brain synaptosomal membranes / T. Matsuda, J.R. Cooper // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1981. — Vol. 78, № 9. — P. 5886–5889.
29. Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins. Promotion of superoxide production by protons and anions / W.J. Wallace [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257, № 9. — P. 4966–4977.
30. Myoglobin — catalyzed tyrosine nitration: no need for peroxynitrite / K. Kilinc [et al.] // *J. Biochem. Biophys. Res. Communications.* — 2001. — № 2. — P. 273–276.
31. Nothing of chemistry disappears in biology': the top 30 damage-prone endogenous metabolites / C. Lerma-Ortiz [et al.] // *J. Biochem. Soc. Trans.* — 2016. — № 44. — P. 961–971.
32. Ostrovskii, Y.M. Thiamine / Y.M. Ostrovskii. — Minsk: Sci. Technol. — 1971.
33. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide / I.I. Stepuro [et al.] // *J. Biochem. (Mosc.)*. — 2012. — Vol. 77, № 1. — P. 41–55.
34. Pletcher, J. Crystal and molecular structure of thiamine pyrophosphate hydrochloride / J. Pletcher, M. Sax // *J. American Chem. Soc.* — 1972. — Vol. 94, № 11. — P. 3998–4005.

35. Raven, E. L. Chemical reactivity of the active site of myoglobin / E.L. Raven, A.G. Mauk // Acad. Press. — 2000. — Vol. 51. — P. 1–50.
36. Samuni, A. Nitroxides catalytically inhibit nitrite oxidation and heme inactivation induced by H₂O₂, nitrite and metmyoglobin or methemoglobin / A. Samuni, E. Maimon, S. Goldstein // J. Free Rad. Biol. Med. — 2016. — Vol. 101. — P. 491–499.
37. Shikama, K. Autoxidation of native oxymyoglobin. Kinetic analysis of the pH profile / K. Shikama, Y. Sugawara // J. Biochem. — 1978. — Vol. 91, № 2. — P. 407–413.
38. Spolitak, T. Oxidative hemoglobin reactions: Applications to drug metabolism / T. Spolitak, P.F. Hollenberg, D.P. Ballou // J. Biochem. Biophys. — 2016. — Vol. 600. — P. 33–46.
39. Stepuro, A.I. Role of thiamine thiol form in nitric oxide metabolism / A.I. Stepuro, T.P. Piletskaya, I.I. Stepuro // J. Biochem. (Mosc.). — 2005. — Vol. 70, № 3. — P. 416–429.
40. Stepuro, I.I. Oxidized thiamine derivatives. Mechanisms of formation under exposure to reactive nitrogen and oxygen species and in hemoprotein — catalyzed reactions / I.I. Stepuro, V.I. Stepuro // LAP LAMBERT Academic Publishing. — 2014. — 280 p.
41. Stepuro, I.I. Thiamine and vasculopathies, Prostaglandins / I.I. Stepuro // Leukotrienes and essential fatty acids. — 2005. — Vol. 72, № 2. — P. 115–127.
42. Structure of a thiochrome transformation product / D.A. Oparin [et al.] // J. Chem. Natur. Comp. — 1985. — Vol. 21, № 5. — P. 688–689.
43. Sugawara, Y. Autoxidation of native oxymyoglobin: thermodynamic analysis of the pH profile / Y. Sugawara, K. Shikama // J. Biochem. — 1980. — Vol. 110. — P. 241–246.
44. Tajima, G. Autoxidation of oxymyoglobin. An overall stoichiometry including subsequent side reactions / G. Tajima, K. Shikama // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262, № 26. — P. 12603–12606.
45. The globin-based radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood / D.A. Svistunenko [et al.] // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272, № 11. — P. 7114–7121.

STUDY ON THE STRUCTURE OF CARBONYL-CONTAINING PRODUCTS OF THIAMINE OXIDATION FORMED UNDER THE ACTION OF HYDROGEN PEROXIDE AND METMYOGLOBIN

Stepuro I.I.¹, Aheika S.A.¹, Stsiapura V.I.², Yantsevich A.V.³

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus, Grodno, Republic of Belarus;*

²*Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus;*

³*Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

Summary. *Thiamine, a precursor of the cofactor of thiamine-dependent enzymes, is a highly labile compound capable of undergoing oxidative conversions. Mass spectroscopy methods were used to show that myoglobin oxoferryl forms oxidized thiamine to yield thiochrome, oxodihydrothiochrome and small amounts of thiamine disulfide. Using spectrophotometry and IR-spectroscopy it was detected that oxodihydrothiochrome contained a carbonyl group readily reacting with water or alcohols to form semiacetals. The spectral data indicate that in acid medium, oxodihydrothiochrome is transformed to 3'-oxothiamine, an analog of the thiamine molecule with a carbonyl group on the carbon atom of the methylene bridge connecting the pyrimidine and thiazole rings. A possible role of the carbonyl thiamine derivatives in inhibition of thiamine-dependent enzymes is discussed.*

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ГОМЕОСТАЗИН НА СТЕПЕНЬ РАЗВИТИЯ НЕФРОПАТИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ II ТИПА У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

Туманов А.В., Островский А.А., Полубок В.Ч., Марчик А.И.

*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Резюме. В экспериментальной модели сахарного диабета II типа у крыс изучено влияние композиции гомеостазин (липоевая кислота/тиамин/тирозин) на степень развития нефропатии при сахарном диабете II типа у крыс.

Введение. Известно, что ожирение является наиболее важным фактором риска развития сахарного диабета II типа [7]. Некоторые данные свидетельствуют о том, что накопление триглицеридов в скелетных мышцах и островках поджелудочной железы причинно связано с резистентностью к инсулину скелетных мышц и дисфункцией В-клеток поджелудочной железы при ожирении [4, 6, 7, 16]. Кроме того, хранение избыточных триглицеридов и длинноцепочечных жирных ацил-КоА, как полагают, увеличивает образование свободных радикалов кислорода в клетках [3, 16]. Эти факты привели к гипотезе, что при ожирении повышенное накопление липидов в скелетных мышцах и островках поджелудочной железы усиливает окислительный стресс и вызывает функциональные дефекты в этих тканях, что приводит к развитию сахарного диабета II типа [3, 10].

Предполагается, что композиция гомеостазин (липоевая кислота/тиамин/тирозин) может оказывать защитный эффект при развитии сахарного диабета II типа, предотвращая развитие осложнений благодаря своим регуляторным, антиоксидантным и антистрессорным свойствам, влиянию на различные метаболические процессы. Альфа-липоевая кислота (ЛК) представляет собой встречающуюся в природе короткоцепочечную жирную кислоту с сульфгидрильными группами, которая обладает мощной антиоксидантной активностью в самых разных экспериментальных системах и клинически используется для лечения диабетической невропатии [1, 11]. Было показано, что ЛК защищает от инсулинорезистентности, индуцированной окислительным стрессом *in vitro* [5, 8, 13], стимулирует утилизацию периферической глюкозы у преддиабетических крыс с ожирением [14] и пациентов с сахарным диабетом II типа [9].

Существует также достаточно клинических и экспериментальных данных, свидетельствующих о благотворном влиянии добавок тиамина на осложнения диабета таких, как диабетическая ретинопатия, диабетическая нефропатия, диабетическая невропатия и диабетическая кардиомиопатия [2, 12].

Данных о предупреждении развития сахарного диабета II типа тирозином не найдено, однако теоретически он может оказывать благоприятное действие, так как является мягким психостимулятором, повышающим устойчивость к стрессу.

В связи с отмеченным целью данного исследования стало изучение влияния композиции гомеостазин на структурные изменения в почках лабораторных крыс с экспериментальным сахарным диабетом II типа.

Материалы и методы исследования. Моделирование сахарного диабета II типа проводилось на крысах-самцах ($n = 26$) массой 210–230 г с использованием высокожировой диеты (4,5 ккал/г, 43 ккал % жиров) в течение 4 месяцев и двухкратными внутривентральными инъекциями стрептозотоцина (СТЗ, 20 мг/кг), который вводился после трех месяцев использования данной диеты. Контрольные крысы содержались на стандартной диете вивария (2,2 ккал/г).

В данной серии участвовали следующие группы животных:

- группа № 1 (контроль; 9 шт.);
- группа № 2 (диабет; 8 шт.). Группа с сахарным диабетом II типа;
- группа № 3 (диабет+гомеостазин; 9 шт.). Определялось влияние композиции гомеостазин на степень развития нарушений при сахарном диабете II типа.

Гомеостазин вводили животным внутривентрально каждый день натощак в течение 25 дней после развития сахарного диабета II типа.

Все процедуры, связанные с уходом за животными (кормление, поение, смена подстилки, пересаживание, мытье клеток, уборка помещений, в которых содержатся животные, и другие процедуры), выполнялись в соответствии с СОП.

У животных забирали левую почку, взвешивали и фиксировали для дальнейшего гистологического исследования. Из почек вырезали поперечный фрагмент в центральной части органа толщиной около 4–5 мм. Его фиксировали 3 ч в смеси формалин-спирт-уксусная кислота (пропорции компонентов 9:3:1), отмывали 12 ч в проточной воде, обезвоживали в спиртах и ксилоле и заливали в парафин. Делали поперечные гистологические срезы, причем так, чтобы среди них были срезы, которые проходили через часть органа с открытыми воротами почки [15].

На срезах измеряли площадь коры, внешнего и внутреннего мозгового вещества (медулы), площадь дистрофических канальцев, подсчитывали количество клубочков в коре. Полученные данные использовали как в абсолютных значениях, так и переводили в относительные значения.

Все количественные данные обрабатывали с помощью статистической программы *GraphPad Prism* (версия 5.0). Результаты представляли в виде коэффициента корреляции, а также как среднее арифметическое \pm ошибка средней ($M \pm m$). Для оценки достоверности различий между средними использовали непарный t-тест и тест Манна – Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. На поперечном центральном срезе почек во всех случаях присутствовали основные структурные компоненты органа: кора, покрытая капсулой, наружная и внутренняя части медулы, просвет лоханки, жировая клетчатка вместе с кровеносными сосудами, которые заполняют открытые ворота органа. На многих срезах также можно увидеть часть мочевого сосочка, которым заканчивается внутренняя медула, и начало мочеточника. Основной объем коры почки занимают извитые канальцы (проксимальные и дистальные), капиллярные клубочки, вены и артерии (последние чаще всего располагаются рядом друг с другом). Большинство клубочков находятся ближе к капсуле почки, но не вплотную к ней (рис. 1). Небольшое число капиллярных клубочков можно найти и в более глубоких слоях коры — ближе к лоханке почки или наружной части ее медулы (см. рис. 1).

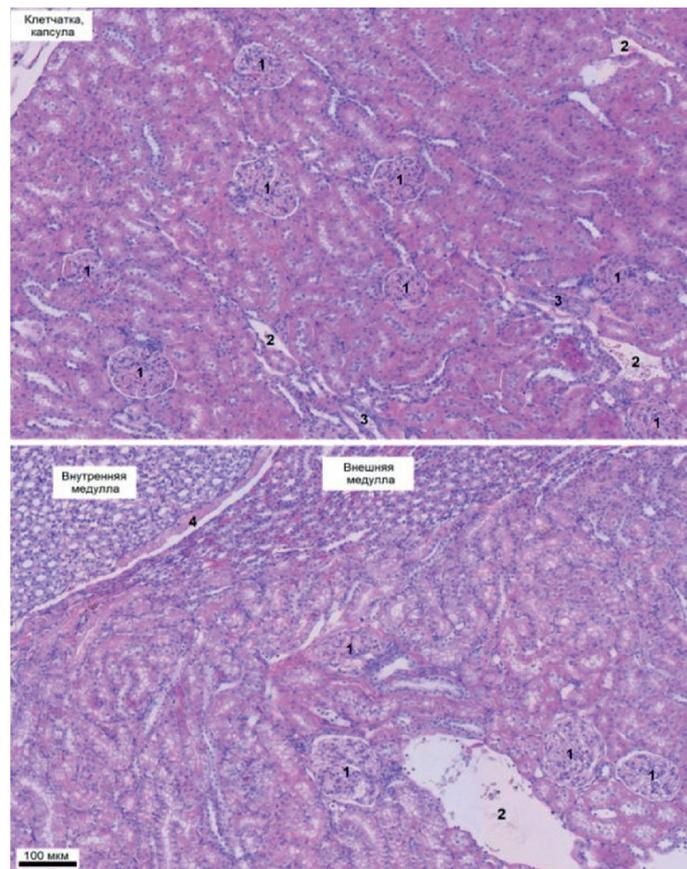


Рисунок 1 — Структурные компоненты коры почки крысы контрольной группы

Вверху показан участок ближе к капсуле, внизу — ближе к наружной части медуллы и просвету лоханки (4). Видно, что основную площадь срезов коры занимают извитые канальцы, капиллярные клубочки (1), вены (2), артерии (3)

Границы между корой почки и внешней медулой, а также между последней и внутренней медулой (с их соответствующими компонентами и особенностями строения) обычно видны достаточно хорошо.

В почках животных 2-й и 3-й диабетических групп не только анатомические, но и многие гистологические черты были аналогичны контрольным, однако чаще встречались очаги мононуклеарной инфильтрации (рис. 2).

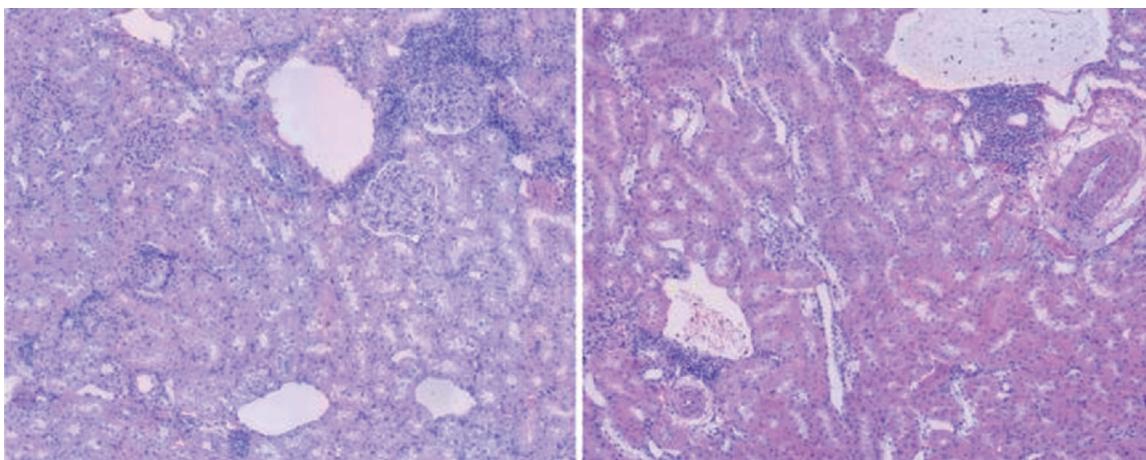


Рисунок 2 — Очаги мононуклеарной инфильтрации в коре почек крыс обеих диабетических групп

Главным же отличием стало то, что у крыс контрольной и диабетической групп нередко можно было встретить участки канальцев с признаками дистрофических изменений. Такие участки контрастно отличались от соседних недистрофичных канальцев прозрачной, почти «стеклянной», цитоплазмой. При этом клеточные ядра располагались центрально (рис. 3).

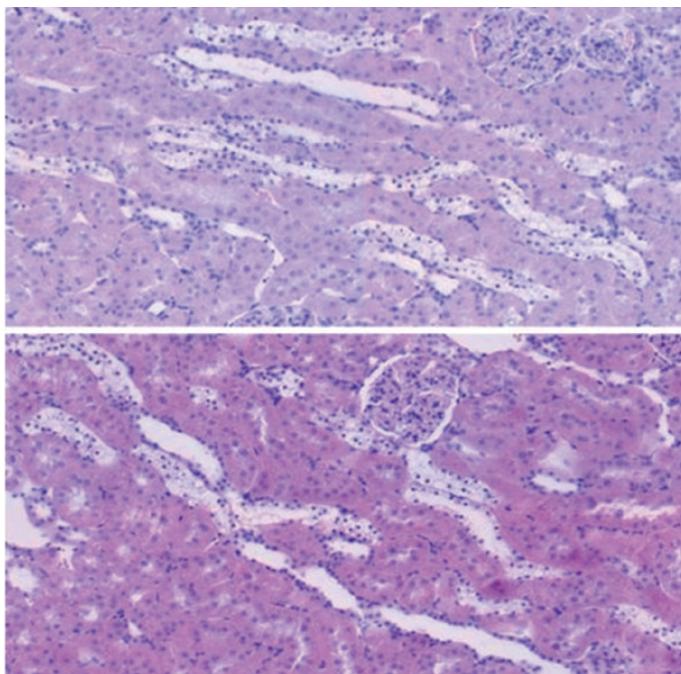


Рисунок 3 — Примеры участков коры с дистрофическими канальцами
Показаны фото почек двух разных животных

Дистрофически измененные канальцы находились на территории коры и, как правило, проходили параллельно собирательным трубкам. Они были обнаружены в значительном количестве у трех крыс из 2-й группы и в восьми — из 3-й. У других животных диабетических групп дистрофия канальцев выявлена не была.

Абсолютная площадь срезов почки, ее коры и внешнего мозгового вещества в расчете на 100 г массы тела животных была достоверно большей у крыс 3-й группы по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1 — Отличия по размерам основных структур, присутствующих на центральных срезах почек, в расчете на 100 г массы тела крысы

Группа, достоверность	Площадь (мм ²) в расчете на 100 г массы тела	
	Площадь коры	Площадь внешней медулы
Контроль	9,76 ± 0,18	1,01 ± 0,06
Диабет	9,66 ± 0,43	1,08 ± 0,03
<i>P</i> ₁	0.8280	0.3298
<i>P</i> ₂	0.4234	0.1617
Диабет + гомеостазин	10,3 ± 0,145	1,28 ± 0,07
<i>P</i> ₁	0.0299	0.0104
<i>P</i> ₂	0.0188	0.0171

Примечание: здесь и дальше *P*₁ — степень достоверности относительно контроля по непарному *t*-тесту; *P*₂ — степень достоверности по тесту Манна – Уитни.

В определенной степени похожая ситуация оказалась в отношении показателей, которые характеризовали плотность распределения капиллярных клубочков в коре почек. При почти одинаковой численности данных структур в расчете на один срез (немногим более 200 штук) их количество в расчете на 1 мм² площади коры (плотность распределения) оказалась достоверно меньшей, чем в контроле, у животных 3-й группы и с тенденцией к уменьшению у животных 2-й группы (табл. 2).

Таблица 2 — Отличия между группами животных по количеству капиллярных клубочков на срезах их почек и степень дистрофии канальцев

Группа, достоверность	Коло-во клубочков на 1 мм ² площади коры	Суммарная площадь дистрофических канальцев на срезе
Контроль	6,57 + 0,293	0,0004 ± 0,0004
Диабет	5,35 + 0,269	0,208 ± 0,133
<i>P1</i>	0.0084	0.1168
<i>P2</i>	0.0274	0.1746
Диабет + гомеостазин	5,15 ± 0,132	0,746 ± 0,138
<i>P1</i>	0.0004	0.0001
<i>P2</i>	0.0019	0.0010

Таким образом, обобщая, можно сказать, что проведенное исследование позволило выявить тенденцию к повышению вероятности появления в почках диабетических животных признаков дистрофии канальцев (тубулопатии), увеличения мононуклеарной инфильтрации коры, ее возможного отека. При этом гомеостазин не помогал снижению данных показателей.

Заключение. Разработан подход к достаточно точному морфометрическому анализу структурной организации почек лабораторных крыс, который основан на получении их поперечных центральных срезов. Выявлено, что экспериментальный сахарный диабет II типа вызывает в почках самцов крыс тенденцию к повышению вероятности отека коры (оцененную по уменьшению плотности распределения капиллярных клубочков в ней), проявлений монануклеарной инфильтрации коры, дистрофических изменений канальцевого эпителия в ней. Введение гомеостазина не уменьшило данные проявления.

Список литературы

1. Biewenga, G.P. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid / G.P. Biewenga, G.R. Haenen, A. Bast // *Gen. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 29. — P. 315–331.
2. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications / M. Brownlee // *Nature.* — 2001. — Vol. 414. — P. 813– 820.
3. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? / S.J. Bakker [et al.] // *Atherosclerosis.* — 2000. — Vol. 148. — P. 17–21.
4. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes / G.F. Lewis [et al.] // *J. Endocr. Rev.* — 2002. — Vol. 23. — P. 201–229.
5. El Midaoui, A. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid / A. El Midaoui, J. de Champlain // *Hypertension.* — 2002. — Vol. 39. — P. 303–307.
6. Kelley, D.E. Skeletal muscle triglyceride: an aspect of regional adiposity and insulin resistance / D.E. Kelley, B.H. Goodpaster // *J. Diabetes Care.* — 2001. — Vol. 24. — P. 933–941.
7. Lieberman, L.S. Dietary, evolutionary, and modernizing influences on the prevalence of type 2 diabetes / L.S. Lieberman // *J. Annu. Rev. Nutr.* — 2003. — Vol. 23. — P. 345–377.
8. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3–L1 adipocytes / A. Rudich [et al.] // *J. Diabetologia.* — 1999. — Vol. 42. — P. 949–957.

9. Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial / S. Jacob [et al.] // *J. Free Radic. Biol. Med.* — 1999. — Vol. 27. — P. 309–314.
10. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes / J.L. Evans [et al.] // *J. Endocr. Rev.* — 2002. — Vol. 23. — P. 599–622.
11. Packer, L. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications / L. Packer, K. Kraemer, G. Rimbach // *J. Nutrition.* — 2002. — Vol. 17. — P. 888–895.
12. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine / R. Babaei-Jadidi [et al.] // *J. Diabetes.* — 2003. — Vol. 52. — P. 2110–2120.
13. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid / B.A. Maddux [et al.] // *J. Diabetes.* — 2001. — Vol. 50. — P. 404–410.
14. The antioxidant alpha-lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle / S. Jacob [et al.] // *J. Diabetes.* — 1996. — Vol. 45. — P. 1024–1029.
15. *Toxicology of the Kidney* / R. Ferdinand [et al.]. — London: CRC Press, 2004. — 1200 p.
16. Unger, R.H. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover / R.H. Unger, Y.T. Zhou // *J. Diabetes.* — 2001. — Vol. 50. — P. 118–121.

EFFECT OF THE HOMEOSTAZIN COMPOSITION ON THE DEVELOPMENT OF NEPHROPATHY IN TYPE II DIABETES MELLITUS IN LABORATORY RATS

Tumanov A.V., Ostrowski A.A., Polubok V.Ch., Marchik A.I.

*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *An experimental model of type II diabetes mellitus in rats was used to study the effect of the homeostazin composition (lipoic acid/thiamine/tyrosine) on the extent of the development of nephropathy in type II of diabetes mellitus.*

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРОКАТЕХИНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ У КРЫС С ОСТРЫМ ВОСПАЛЕНИЕМ КОЖИ

*Туманов А.В.¹, Шляхтун А.Г.¹, Мороз В.Л.¹, Марчик А.И.¹,
Полубок В.Ч.¹, Островский А.А.¹, Бакунович А.А.¹, Ерошенко Ю.В.¹,
Семенкова Г.Н.², Сорокин В.Л.², Шадыро О.И.²*

*¹Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гродно, Республика Беларусь;
²Белорусский государственный университет,
г. Минск, Республика Беларусь*

Резюме. В экспериментальной модели острого воспаления кожи (ожог III Б степени) проведена оценка противовоспалительной активности пространственно-экранированных производных пирокатехина.

Введение. Под галогенирующим стрессом понимают неспецифическую реакцию организма на воздействие активных форм галогенов, когда их продукция в организме является избыточной и не может быть нейтрализована компонентами антиоксидантной системы. К активным формам галогенов относят хлорноватистую (ХК) и бромноватистую кислоты, а также их анионы, которые образуются в галогенирующем цикле миелопероксидазы (МПО) при взаимодействии галогенид-ионов с пероксидом водорода. Наибольшую опасность для организма представляет ХК, поскольку концентрация ионов хлора значительно выше, чем ионов брома. ХК является сильным окислителем, повреждая жизненно важные молекулы, что приводит к модификации либо к деструкции клеток и тканей. ХК образуется в организме преимущественно в нейтрофилах, поскольку МПО присутствует в этих клетках в наибольшем количестве. Образование хлорноватистой кислоты происходит и во внеклеточной среде, поскольку активация нейтрофилов к фагоцитозу сопровождается усиленной секрецией МПО из клеток.

Исходя из сказанного выше, разработка новых подходов, направленных на предупреждение возникновения галогенирующего стресса в организме и, как следствие, препятствующих развитию воспалительного процесса, является актуальной. Наиболее эффективным подходом для достижения этой цели является поиск универсальных ингибиторов МПО либо создание веществ с комплексным действием, которые способны не только ингибировать МПО, но и предотвращать секрецию этого фермента из клетки, а также утилизировать ХК безрадикальным путем [1, 2]. Предполагается, что пространственно экранированные производные пирокатехина таким действием могут обладать. В свою очередь они обладают антиоксидантной и противомикробной активностью, а также противовоспалительными, нейропротекторными и противоопухолевыми свойствами [5, 6].

Таким образом, цель данного исследования состояла в оценке противовоспалительной активности пространственно-экранированных производных пирокатехина в условиях острого воспаления кожи у крыс, вызванного ожогом III Б степени.

Материалы и методы исследования. В работе использованы новые производные пирокатехина:

- 1) 4,6-ди-трет-бутил-3-(2-сульфанилэтилиминометил)-1,2-дигидроксибензол (П1);
- 2) 4,6-ди-трет-бутил-3-[-(2-фениламингидразинилиден)метил] бензол-1,2-диол (П2);
- 3) [(2,3-дигидроксифенил) метилен] гидразид 4-пиридинкарбоновой кислоты (П3).

Синтез этих соединений описан в соответствующей работе [16].

Исследование выполнено на 50 крысах-самках линии Wistar весом 200–220 г. Все процедуры, связанные с уходом за животными (кормление, поение, смена подстилки, пересаживание, мытье клеток, уборка помещений, в которых содержатся животные, и другие процедуры) выполнялись в соответствии с СОП.

Определяли изменение биохимических и иммунологических показателей в ответ на внутрижелудочное (в/ж) введение пространственно экранированных пирокатехинов при остром воспалительном процессе кожи (ожог III Б степени).

Животные были поделены на пять групп. Крысам первой группы (контрольная) в/ж вводили подсолнечное масло. У животных остальных четырех групп моделировали ожог III Б степени. При этом крысам 2-й группы в/ж вводили только подсолнечное масло, а животным 3-й, 4-й и 5-й групп интрагастрально вводили растворенные в подсолнечном масле пирокатехины 1, 2, 3 соответственно. Через 4 дня после ожогового воздействия животных декапитировали.

Для иммунологических исследований использовали гепаринизированную кровь животных, где оценивали относительное количество моноцитов [3, 4]. Определение содержания интерлейкина-10 в сыворотке крови проводилось набором Rat IL-10 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, R1000 согласно инструкции производителя.

Пероксидазная активность миелопероксидазы в сыворотке крови оценивалось по методу Josephy [11]. Псевдогалогенирующую активность миелопероксидазы сыворотки крови оценивали по методу Weiss [8]. Оксидазную активность церулоплазмينا (ЦП) оценивали в нашей модификации метода Ravin [13]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) сыворотки крови определяли по методу Paglia и Valentine [12]. Для оценки содержания общих тиолов в сыворотке крови использовали метод Элмана [9].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов статистических программ GraphPad Prism v.8.0 и StatSoft STATISTICA 12.0. Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Шапиро – Уилка. Значимость различий исследуемых несвязанных выборочных данных определяли при помощи дисперсионного анализа и теста средневзвешенного Тьюки. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$).

Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое в выборочной совокупности, m — стандартная ошибка среднего.

Результаты исследования и их обсуждение. У крыс второй группы (ожог) на 4-е сутки течения процесса пероксидазная активность миелопероксидазы, активность глутатионпероксидазы и уровень свободных SH-групп оставались на уровне контрольных значений (табл. 1). Также несколько увеличивалась (в 1,3 раза) оксидазная активность церулоплазмينا.

Таблица 1 — Активность МПО, ЦП, ГПО и содержание свободных SH-групп в сыворотке крови крыс при моделировании острого воспаления кожи

Показатель	Контроль (1 гр)	Ожог (2гр)	Ожог+П1 (3гр)	Ожог+П2 (4гр)	Ожог+П3 (5гр)
Пероксидазная активность МПО, мкмоль ТМВ /мин/мл	71,68 ± 6,16	65,98 ± 1,69	64,58 ± 3,12	65,40 ± 4,17	67,64 ± 2,76
Псевдогалогенирующая активность МПО, мкмоль ТауNHCl/мин/мл	0,91 ± 0,05	5,55 ± 0,77 ***	2,49 ± 0,23 *###	2,33 ± 0,26 *##	2,30 ± 0,14 *###
Оксидазная активность ЦП, мкМ ВВ/мин/мл	57,24 ± 3,04	79,34 ± 8,55	128,50 ± 25,05**	74,18 ± 8,56	81,71 ± 6,75
ГПО, мкмоль НАДФН/мин/мл сыворотки	178,11 ± 24,71	165,36 ± 19,42	208,29 ± 21,63	154,40 ± 13,76	155,28 ± 7,63
SH-группы, мкмоль/мл сыворотки	303,11 ± 11,44	286,11 ± 21,77	220,08 ± 21,56*#	191,18 ± 12,06 **###	212,58 ± 15,77 *#

Примечание: 1 *, **, *** — $p < 0,05, 0,01, 0,001$ по сравнению с группой Контроль; 2 #, ##, ### — $p < 0,05, 0,01, 0,001$ по сравнению с группой «Ожог».

Псевдогалогенирующая активность миелопероксидазы увеличилась в 6 раз по сравнению с контрольной группой, что подтверждает развитие воспалительных процессов при ожоге III Б степени.

При в/ж введении П1 крысам с ожоговыми ранами (3-я группа) пероксидазная активность миелопероксидазы оставалась на уровне контрольной группы. Активность глутатионпероксидазы незначительно увеличивалась, однако уровень свободных SH-групп достоверно снижался на 30 % по сравнению с контрольной группой и на 24 % по сравнению с ожоговой. Вероятно, это связано с тем, что высокие концентрации фенольных соединений оказывают прооксидантное действие, при котором интенсифицируется генерация в клетках активных форм кислорода и происходит окисление SH-групп белков и глутатиона [14, 15]. Активность церулоплазмينا также достоверно увеличивалась по сравнению с контрольной и ожоговой группой. Псевдогалогенирующая активность миелопероксидазы достоверно уменьшалась в 2,2 раза по сравнению с ожоговой группой, но все же была выше контрольных значений. Следовательно, П1 снижает уровень ХК, предотвращая тем самым галогенирующий стресс, и препятствует развитию воспалительного процесса.

В/ж введение П2 и П3 крысам с ожоговыми ранами (4-я и 5-я группы) оказывает практически идентичное влияние на описываемые процессы. Пероксидазная активность миелопероксидазы и активность глутатионпероксидазы оставалась на уровне контрольной группы. Уровень свободных SH-групп снижался как по сравнению с контрольной, так и ожоговой группами. Оксидазная активность церулоплазмينا оставалась на уровне второй группы (ожог). Псевдогалогенирующая активность миелопероксидазы достоверно снижалась в 2,5 раза по сравнению с группой «ожог».

Таким образом, при в/ж введении П1, П2 и П3 крысам с ожоговыми ранами снижается уровень ХК, предупреждая возникновение галогенирующего стресса в организме и, как следствие, препятствует развитию воспалительного процесса.

Ожоговая рана может вызывать местный и системный воспалительный ответ и индуцировать выработку различных медиаторов воспаления, таких как, например, интерлейкин-10 (IL-10) [10]. IL-10 является противовоспалительным цитокином, который в основном продуцируется моноцитами. Его содержание при остром воспалении кожи возрастает [17]. В нашем исследовании у крыс 2-й группы содержание IL-10 в сыворотке крови через 4 дня после индуцирования ожога возрастает на 28 % (табл. 2) по сравнению с контрольной группой. Относительное количество моноцитов в этой группе было самым высоким.

Таблица 2 — Концентрация IL-10 в сыворотке крови и относительное количество моноцитов в цельной крови крыс при моделировании острого воспаления кожи

Показатель	Контроль (1 гр)	Ожог (2гр)	Ожог+П1 (3гр)	Ожог+П2 (4гр)	Ожог+П3 (5гр)
Концентрация IL-10, пг/ мл	11,8 ± 0,9	16,5 ± 2,3	14,8 ± 1,1	16,4 ± 1,6	14,4 ± 0,9
Моноциты,%	6,50 ± 0,67	11,10 ± 1,20	7,40 ± 0,98	5,56 ± 1,06 ^b	6,30 ± 0,88 ^b

Примечание: а — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; b — $p < 0,05$ по сравнению с группой «Ожог».

При в/ж введении П1 и П3 крысам с ожоговыми ранами содержание IL-10 снижается по сравнению со второй группой на 10,5 % и 12,6 % соответственно. У крыс четвертой группы (ожог+П2) содержание IL-10 оставалось на уровне второй группы (ожог). Снижение содержания IL-10 при введении П1 и П3 крысам с ожоговыми ранами свидетельствует о снижении воспалительного процесса. Относительное количество моноцитов в третьей, четвертой и пятой группах также снижается.

Заключение. В условиях острого термического повреждения кожи наблюдалось достоверное повышение псевдогалогемирующей активности миелопероксидазы, причем ее пероксидазная активность не изменялась. В данной группе активность глутатионпероксидазы, оксидазная активность церулоплазмينا, уровень свободных SH-групп достоверно не изменялись. Назначение опытным животным пространственно экранированных пирокатехинов достоверно понижало псевдогалогемирующую активность миелопероксидазы по сравнению с контрольной ожоговой группой, но данный показатель оставался повышенным относительно интактного контроля. В опытных группах с применением пирокатехинов не наблюдалось изменений в пероксидазной активности миелопероксидазы, активности глутатионпероксидазы и оксидазной активности церулоплазмينا, однако уровень свободных SH-групп достоверно снижался по отношению к обеим контрольным группам. Содержание IL-10 как в контрольной ожоговой группе, так и при введении пирокатехинов достоверно не отличалось от значений животных интактной группы, однако у крыс с острым термическим повреждением кожи на фоне ежедневного внутривенного введения каждого из трех производных пирокатехинов на 4 сутки отмечалось восстановление относительного количества моноцитов до уровня контрольных значений.

Список литературы

1. Взаимодействие пространственно-экранированных фенолов и хинонов с органическими радикалами / И.П. Едимичева [и др.] // Журнал общей химии. — 2005. — Т. 75, № 4. — С. 632–635.
2. Ершов, В.В. Пространственно-затрудненные фенолы / В.В. Ершов, Г.А. Никифоров, А.А. Володькин. — М.: Химия. — 1972. — 352 с.
3. Новиков, Д.К. Клиническая иммунопатология: руководство. / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков. — М.: Мед. литература, 2009. — С. 273–288.
4. Новикова, И.А. Метод комплексной оценки вне- и внутриклеточных факторов бактерицидности нейтрофилов: инструкция по применению / И.А. Новикова, В.В. Железко. — Гомель: Гомельский государственный медицинский университет, 2014. — С. 27.
5. Пространственно-затрудненные фенолы — перспективный класс новых ноотропных средств / Т.А. Михасько [и др.] // Медицинские новости. — 2002. — Т. 82, № 4. — С. 81–84.
6. Синтез и противовирусная активность некоторых производных 3,5 ди-трет-бутилпирокатехина / Д.К. Петрекевич [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. — 1995. — Т. 29, № 12. — С. 32–34.

7. Assessment of interleukins IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 in acute urticaria / J. Papadopoulos [et al.] // J Clin Med Res. — 2014. — Vol. 6, № 2. — P. 133–137.
8. Chlorination of taurine by human neutrophils / S.J. Weiss [et al.] // J. Clin. Invest. — 1982. — Vol. 70. — P. 582–607.
9. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — Vol. 82, № 1. — P. 70–77.
10. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell transplantation in rat burn models / J. Zhang [et al.] // J. ClinExpPathol. — 2015. — Vol. 8, № 5. — P. 5129–5136.
11. Josephy, P.D. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates / P.D. Josephy, T. Eling, R.P. Mason // J. Biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 3669–3675.
12. Paglia, D.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / D.E. Paglia, W.N. Valentine // J. Lab. Clin. Med. — 1967. — Vol. 70, № 1 — P. 158–169.
13. Ravin, H.A. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin / H.A. Ravin // J. Lab. Clin. Med. — 1961. — Vol. 58. — P. 161–168.
14. Role of quinones in toxicology / J.L. Bolton [et al.] // Chemical research in toxicology. — 2000. — Vol. 13, № 3. — P. 136–160.
15. Schweigert, N. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals / N. Schweigert, A.J.B. Zehnder, R.I.L. Eggen // Environmental Microbiology. — 2001. — Vol. 3, № 2. — P. 81–91.
16. Synthesis of 3,5-di-tert-butyl-1,2-dihydroxybenzene derivatives and their effect on free-radical oxidation of hexane and oxygen activation ability of neutrophils / G.A. Ksendzova [et al.] // Russian Journal of General Chemistry. — 2019. — Vol. 89, № 3. — P. 391–398.

EFFECT OF PYROCATECHIN DERIVATIVES ON BLOOD BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN RATS WITH CHRONIC SKIN INFLAMMATION

***Tumanov A.V.¹, Shlyahtun A.H.¹, Moroz V.L.¹, Marchik A.I.¹,
Polubok V.Ch.¹, Ostrovsky A.A.¹, Bakunovich A.A.¹, Yarashenko Y.V.¹,
Semenkova G.N.², Sorokin V.L.², Shadyro O.I.²***

*¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus;
²Belarusian State University,
Minsk, Republic of Belarus*

Summary. An experimental model of acute skin inflammation (III B stage burn) was used to evaluate the anti-inflammatory activity of spatially shielded pyrocatechin derivatives.

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ PPAR-РЕЦЕПТОРОВ НА НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС

*Шляхтун А.Г.¹, Радута Е.Ф.¹, Сутько И.П.¹, Богдевич Е.В.¹, Каспер Е.В.¹, Марчик А.И.¹,
Турсунходжаева Ф.М.², Разводовский Ю.Е.¹, Семененя И.Н.¹*

*¹Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»
г. Гродно, Республика Беларусь*

*²Институт химии растительных веществ имени академика С.Ю. Юнусова
Академии наук Республики Узбекистан
г. Ташкент, Республика Узбекистан*

Резюме. Исследовано влияние агонистов PPAR рецепторов, фенофибрата и метформина, на нейрохимические изменения в отделах головного мозга при субхронической алкогольной интоксикации у крыс. Показано, что фенофибрат и метформин дозозависимо нормализуют уровни PPAR α в ткани базальных ганглиев, а также катехол- и индоламинов в гипоталамусе крыс при субхронической алкогольной интоксикации.

Злоупотребление алкоголем наносит серьезный вред здоровью человека и тяжелым бременем экономических потерь ложится на плечи государства. Несмотря на значительные успехи, достигнутые современной медициной в лечении многих заболеваний, эффективность лечения алкогольной зависимости остается достаточно низкой. Согласно официальным данным, в состоянии ремиссии от 1 до 2 лет находится 14,8% пациентов, состоящих на учете в наркологических учреждениях Беларуси. Воздерживаются от употребления алкоголя более 2-х лет только 9% пациентов [15].

В связи с отсутствием четких схем фармакотерапии, в настоящее время лечение алкогольной зависимости характеризуется полипрагмазией, что приводит к частым побочным эффектам. В арсенале медикаментозных средств, использующихся в клинической практике, лишь несколько препаратов имеют доказательную базу своей эффективности: дисульфирам (ингибитор альдегиддегидрогеназы), акампросат (антагонист глутамата), налтрексон и налмефен (антагонисты опиоидных рецепторов). При этом ни один из данных препаратов не может считаться идеальным с точки зрения эффективности и безопасности использования. В связи с этим продолжается поиск эффективных средств лечения алкогольной зависимости, которые должны соответствовать следующим критериям: снижать тягу к алкоголю, устранять эйфорию, вызванную приемом алкоголя, и таким образом блокировать механизмы подкрепления, обладать минимальными побочными эффектами.

Учитывая высокую стоимость и длительность разработки новых препаратов, в настоящее время активно реализуется альтернативный подход — использование уже известных лекарственных средств по новому назначению, в том числе для лечения алкогольной зависимости. Накоплено достаточно свидетельств эффективности некоторых агонистов PPAR,

применяющихся в клинике, в экспериментальных моделях алкоголизма. Показано, что агонисты PPAR α рецепторов, в частности клофибрат, фенофибрат и некоторые другие фибраты, а также метформин, смешанный агонист α , γ , β/δ подтипов PPAR-рецепторов, вызывают значительное снижение уровня добровольного потребления этанола у крыс [1, 3]. Механизмы, лежащие в основе данного феномена, не до конца понятны и требуют детального изучения. Антиалкогольный эффект агонистов PPAR рецепторов может быть обусловлен нормализацией нейрохимических показателей в отделах головного мозга, входящих в систему позитивного подкрепления.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния агонистов PPAR-рецепторов, фенофибрата и метформина, на нейрохимические изменения при субхронической алкогольной интоксикации у крыс для выявления возможных механизмов антиалкогольного действия соединений.

Материалы и методы исследования. Исследовано влияние агонистов PPAR-рецепторов, фенофибрата и метформина, вводимых внутрижелудочно на протяжении 5 суток в дозах 100, 250 и 500 мг/кг в сутки, на уровни нейроактивных соединений — свободных аминокислот и биогенных аминов в отделах головного мозга крыс (большие полушария, базальные ганглии, гипоталамус) при субхронической алкоголизации.

В работе использовали реактивы и растворители квалификации не ниже «хч». Использовали агонисты PPAR производства «Sigma-Aldrich» (США). При анализе свободных аминокислот в пробах головного мозга использовалась стандартная смесь физиологических аминокислот (Aldrich, США). Буферные растворы готовили с использованием деионизированной воды, полученной на системе Hydrolab Ultra (Hydrolab, Польша). Для алкоголизации крыс использовали спирт-ректификат марки «Люкс», который перед использованием разводили с использованием очищенной питьевой воды.

Исследования проводили на половозрелых самцах крыс линии Wistar начальной массой 180–200 г, полученных в виварии Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. Животные содержались при естественном световом режиме, температуре воздуха +22(\pm 3) °С, относительной влажности 50–60 %, в пластиковых клетках для крыс по 8 особей. Доступ к воде и корму на протяжении всего эксперимента *ad libitum*. Животные были разделены на экспериментальные группы по 10 особей в каждой.

Субхроническую алкогольную интоксикацию вызвали внутрижелудочным введением 30 % в/о раствора этанола в дозе 5 г/кг в сутки на протяжении 5 суток. Агонисты PPAR вводились животным на фоне алкогольной интоксикации. Агонист PPAR α рецепторов фенофибрат и смешанный агонист α , γ , β/δ типов PPAR рецепторов метформин вводились внутрижелудочно в дозах по 100, 250 и 500 мг/кг в сутки в виде тонкой взвеси в 2%-м крахмале. Животные в группах «Контроль» и «Этанол» получали в/ж эквивалентные количества воды. По окончании эксперимента, после 12 ч голодания, крыс эвтаназировали путем декапитации. Головной мозг выделяли без перфузирования, препарировали отделы (большие полушария, базальные ганглии, гипоталамус) и замораживали в жидком азоте. Выбор отделов мозга крыс для исследования обусловлен тем, что основную роль в механизмах подкрепления и зависимости отводят дофаминергическим системам вентральной области покрышки, прилежащему ядру и нейронам медиального переднемозгового пучка, а также нейронам гипоталамуса, которые регулируют пищевое и питьевое поведение.

Образцы тканей хранили до исследования при температуре –82 °С. При проведении экспериментов соблюдались требования, принятые в международной практике биомедицинских

исследований [5]. Для определения уровней нейроактивных аминокислот в отделах мозга использовался хроматограф Agilent 1200 (США), оснащенный детектором флуоресценции. Определение уровней свободных аминокислот проводили в хлорнокислых экстрактах обращенно-фазной хроматографией с предколоночной дериватизацией 0,4%-м ортофталевым диальдегидом и 0,3%-й 3-меркаптопропионовой кислотой в 0,4М Na-боратном буфере (рН 9,4) и детектированием по флуоресценции (340/450 нм). Для разделения ОФА-производных аминокислот использовали градиентное элюирование, как описано ранее [13]. Для разделения биогенных аминов использовали ион-парную ВЭЖХ и детектирование по природной флуоресценции [2]. Количественная оценка полученных значений производилась при помощи программного пакета Agilent ChemStation В 03.04 путем сравнения результатов анализа исследуемых хроматограмм с калибровочной кривой искусственной смеси аминокислот. Биохимические исследования тканей мозга проводили в 10%-х гомогенатах, которые готовили на растворе 1,15%-го КСl, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 7,4. Определение концентраций белка PPAR α в пробах проводилась с использованием иммуноферментного анализа (FineTest ER1283, КНР). Пробы обрабатывались согласно инструкциям производителя.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета статистических программ Graph Pad Prism v.8.0. Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Для выявления статистической значимости отличий между экспериментальными группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA) и тест средневзвешенного Тьюки [8]. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$). Данные в таблицах и на графиках представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое в выборочной совокупности, m — стандартная ошибка среднего значения.

Результаты и обсуждение. При исследовании нейромедиаторных систем алкоголизованных животных установлено, что наиболее выраженные изменения, затронувшие все изученные отделы головного мозга, отмечены в содержании ГАМК и глутаминовой кислоты. Введение агонистов PPAR-рецепторов, фенофибрат и метформина, не сопровождалось значимым влиянием на уровни свободных аминокислот в условиях эксперимента (данные не представлены).

Установлено, что уровни биогенных аминов и их метаболитов при алкоголизации и введении агонистов PPAR статистически значимо изменялись только в гипоталамусе. Показано, что фенофибрат и метформин дозозависимо нормализовали обмен катехол- и индоламинов в гипоталамусе, в частности дофамина и гомованилиновой кислоты, серотонина и 5-гидроксииндолацетата (рисунок).

Наблюдаемое в экспериментах на грызунах антиалкогольное действие агонистов PPAR может быть обусловлено нормализацией метаболизма биогенных аминов и связанных нейромедиаторных систем в гипоталамусе. В иерархии структур мозга гипоталамусу принадлежит важнейшая роль по обеспечению взаимодействия симпатической и парасимпатической нервной системы, регуляции эндокринных желез, основного обмена и гомеостаза. Показано участие гипоталамуса в формировании зависимости к алкоголю [7]. Мы полагаем, что нормализация обмена нейроактивных соединений в гипоталамусе может приводить к снижению добровольного потребления этанола у экспериментальных животных.

Данные о прямом действии фибратов и метформина на системы обмена биогенных аминов или на рецепторы к катехол- и индоламинам не обнаружены. Изменения уровней биогенных аминов в гипоталамусе под влиянием исследованных агонистов PPAR могут быть обусловлены множеством различных факторов, например, их активирующим действием на биогенез мито-

хондрий в отделах головного мозга [4]. Синапсоматальные митохондрии играют важнейшую роль в нейромедиации, поддерживая оптимальную концентрацию ионов кальция в цитоплазме и регулируя передачу сигналов в синапсах. Кроме того, значительная часть обмена биогенных аминов и других нейроактивных соединений протекает непосредственно в митохондриях синапсов.

Для того чтобы установить возможную взаимосвязь между изменениями концентраций нейромедиаторов и уровнем экспрессии PPAR нами исследовано влияние фенофибрата и метформина на содержание PPAR α в отделах головного мозга. В ряде работ показано, что у мышей нокаутных по гену PPAR α агонисты PPAR не снижают потребление и предпочтение этанола, что однозначно свидетельствует об участии PPAR α в развитии алкогольной зависимости у человека и животных [12].

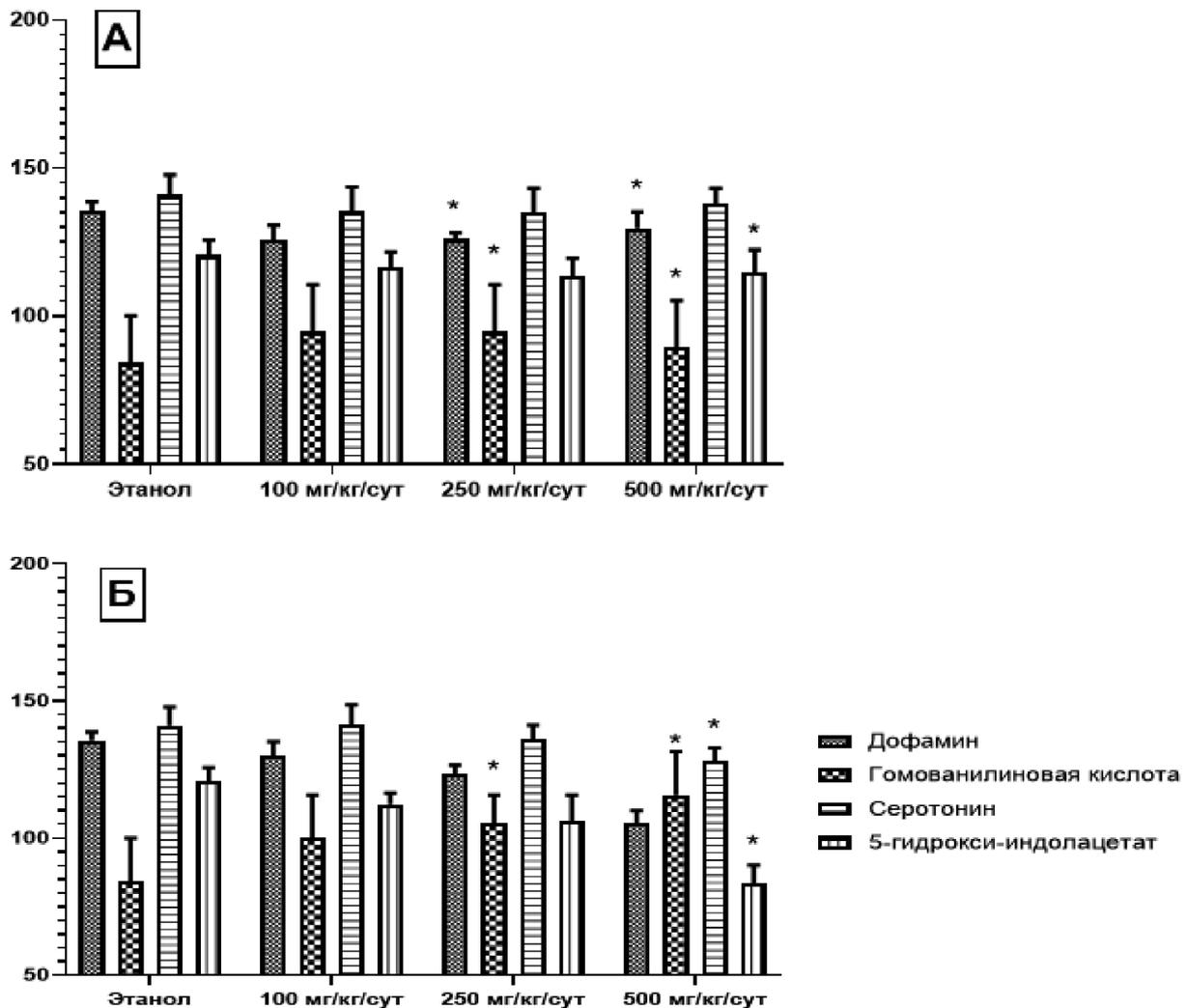


Рисунок — Содержание некоторых биогенных аминов и их метаболитов в гипоталамусе крыс при субхронической алкогольной интоксикации и введении фенофибрата (А) и метформина (Б) в дозах 100, 250 и 500 мг/кг в сутки, % к контролю * $p < 0,05$ по сравнению с группой Этанол

Установлено, что под влиянием субхронической алкоголизации содержание белка PPAR α в базальных ганглиях алкоголизованных крыс снижалось на 30 % по сравнению с контрольными животными. Под влиянием алкогольной интоксикации уровни экспрессии белка PPAR α в ткани гипоталамуса алкоголизованных крыс значительно не изменялись. Введение фенофибра-

та и метформина сопровождалось сохранением экспрессии PPAR α в базальных ганглиях на уровне контрольных значений. Существенного влияния на уровни PPAR α в гипоталамусе фенофибрат и метформин в условиях эксперимента не оказывали (таблица), поэтому вопрос об изменении уровней биогенных аминов в ткани гипоталамуса под влиянием фенофибрата и метформина остается открытым.

Литературных данных о содержании PPAR α рецепторов в отделах головного мозга грызунов мало. Методами иммуногистохимии и гибридизации *in situ* продемонстрировано, что PPAR экспрессируются в ЦНС и демонстрируют как уникальные, так и перекрывающиеся паттерны экспрессии в разных областях и на различных стадиях развития [14]. Экспрессия всех изоформ PPAR-рецепторов наиболее выражена в базальных ганглиях. Интенсивное иммуноокрашивание различных типов PPAR наблюдалось в гигантских стриато-паллидных интернейронах, а также в средних колючих нейронах *caudate putamen* [6]. В работе Moreno с соавт. показано, что в нейронах гипоталамуса были обнаружены иммунопозитивные по PPAR γ и PPAR β/δ , но не к PPAR α клетки [10].

Таблица — Уровень экспрессии PPAR α в базальных ганглиях головного мозга и гипоталамусе крыс при введении агонистов PPAR рецепторов, фенофибрата и метформина, в дозах 150 мг/кг в сутки, на фоне субхронической алкогольной интоксикации, нг/г ткани

Группа	Содержание PPAR α
Базальные ганглии	
Контроль	56,30±4,27
Этанол	39,42±1,91*
Этанол+Фенофибрат	54,81±4,30
Этанол+Метформин	52,07±6,37
Гипоталамус	
Контроль	2,86±0,14
Этанол	3,01±0,19
Этанол+Фенофибрат	3,20±0,11
Этанол+Метформин	3,04±0,13

* — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Возможным объяснением изменения уровней биогенных аминов в гипоталамусе может быть неспецифичность связывания эндогенных и синтетических лигандов с PPAR-рецепторами [9]. Показано, что различные типы PPAR активируются широким спектром как естественных метаболитов, так и синтетических активаторов, причем лиганды одной изоформы PPAR способны изменять экспрессию другой изоформы [11]. Возможно, фенофибрат и метформин изменяют уровни экспрессии PPAR γ или PPAR β/δ в гипоталамусе. Также нельзя полностью исключить прямое влияние фибратов на ферменты обмена биогенных аминов или опосредованное через другие отделы мозга влияние на обмен катехол- и индоламинов в гипоталамусе алкоголизованных животных.

Заключение. Установлено, что введение агонистов PPAR-рецепторов фенофибрата (агонист PPAR α) и метформина (смешанный агонист PPAR α , γ , β/δ) на фоне субхронической алкогольной интоксикации нормализуют обмен катехол- и индоламинов в гипоталамусе крыс. Под влиянием исследованных соединений происходит нормализация содержания PPAR α в ткани базальных ганглиев, но не в гипоталамусе крыс.

Полученные данные показывают, что агонисты рецепторов пролиферации пероксисом нормализуют обмен катехол- и индоламинов в гипоталамусе при субхронической алкогольной интоксикации у крыс и содержание PPAR α в ткани базальных ганглиев. Нормализация обмена биогенных аминов не связана с изменением экспрессии PPAR α в ткани гипоталамуса алкоголизированных животных.

Список литературы

1. Влияние агонистов α - и γ -рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом, на проявления алкогольной зависимости у крыс / А.Г. Шляхтун [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. Выпуск 3. Механизмы регуляции процессов жизнедеятельности в норме и патологии / под общ. ред. И. Н. Семенени : сб. науч. ст. — Минск : ИВЦ Минфина, 2019. — 389 с.
2. Применение ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции для определения биогенных аминов и их предшественников в тимусе и селезенке крыс / Е. М. Дорошенко [и др.] // Сб. тез. респ. науч. конф. по аналитической химии «Аналитика РБ-2010», Минск, 14–15 мая 2010 г. Минск, 2010. — С. 137.
3. Семенени, И.Н. Роль рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом, в контроле алкогольной зависимости и лечении сопутствующих заболеваний печени / И.Н. Семенени, А.Г. Шляхтун, Е.Ф. Радуга // Известия НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2019. — Т. 16, № 2. — С. 244–256.
4. Bezafibrate upregulates mitochondrial biogenesis and influence neural differentiation of human-induced pluripotent stem cells / J. Augustyniak [et al.] // Mol. Neurobiol. — 2019. — Vol. 56. — P. 4346–4363.
5. ETS No.123. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Strasbourg, 1986. — 13 p.
6. Kremarik-Bouillaud, P. Regional distribution of PPAR β in the cerebellum of the rat / P. Kremarik-Bouillaud, H. Schohn, M. Dauca // J. Chem. Neuroanat. — 2000. — Vol. 19. — P. 225–232.
7. Lateral hypothalamus GABAergic neurons modulate consummatory behaviors regardless of the caloric content or biological relevance of the consumed stimuli / M. Navarro [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2016. — Vol. 41, № 6. — P. 1505–1512.
8. McHugh, M. L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA / M. L. McHugh // Biochimica Medica. — 2011. — Vol. 21, № 3. — P. 203–239.
9. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors / H. E. Xu [et al.] // Mol. Cell. — 1999. — Vol. 3. — P. 397–403.
10. Moreno, S. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS / S. Moreno, S. Farioli-Vecchioli, M. Cerù // Neuroscience. — 2004. — Vol. 123, № 1. — P. 131–145.
11. Peroxisome proliferator-activated receptor γ positively controls and PPAR α negatively controls cyclooxygenase-2 expression in rat brain astrocytes through a convergence on PPAR β/α via mutual control of PPAR expression levels / S. Aleshin [et al.] // Mol. Pharmacol. — 2009. — Vol. 76, № 2. — P. 414–424.
12. Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are linked with alcohol consumption in mice and withdrawal and dependence in humans / Y. A. Blednov [et al.] // Alcohol Clin. Exp. Res. — 2015. — Vol. 39. — P. 136–145.
13. Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids / J. W. Henderson [et al.] // Agilent. — Part No. 5980-1193. — 10 p.
14. Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid / R. H. Zetterstrom [et al.] // Eur J Neurosci. — 1999. — Vol. 11. — P. 407–416.
15. World Health Organization. Global status report on alcohol and health / Eds.: V. Poznyak, D. Rekve. — Geneva, 2018. — 450 p.

EFFECT OF PPAR RECEPTOR AGONISTS ON NEUROCHEMICAL CHANGES IN THE BRAIN DURING SUBCHRONIC ALCOHOL INTOXICATION IN RATS

*Shlyahatun A.H.¹, Raduta Ye.F.¹, Sutsko I.P.¹, Bogdevich Ye.V.¹, Kasper Ye.V.¹,
Marchik A.I.¹, Tursunkhodzhaeva F.M.², Razvodovsky Yu.E.¹, Semeneyna I.N.¹*

*¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds,
National Academy of Sciences of Belarus
Grodno, Republic of Belarus*

*²S.Yu. Yunusov Institute of the Chemistry of Plant Substances,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan*

Summary. *A study of the influence of PPAR agonists, fenofibrate and metformin, on neuroactive metabolites in different brain areas during subchronic alcohol intoxication in um rats was carried out. It is shown that fenofibrate and metformin normalized levels of catechol and indolamines in the hypothalamus in a dose-dependent manner that accompanied by normalization the content of PPAR α in the tissue of the basal ganglia but not in a hypothalamus.*

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПЕРОКСИСОМ НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОТМЕНЕ АЛКОГОЛЯ У КРЫС

*Шляхтун А.Г.¹, Радута Е.Ф.¹, Сутько И.П.¹, Янкевич Н.В.¹,
Богдевич Е.В.¹, Марчик А.И.¹, Турсунходжаева Ф.М.², Семененя И.Н.¹*

¹*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,*

г. Гродно, Республика Беларусь;

²*Институт химии растительных веществ имени С.Ю. Юнусова
Академии наук Республики Узбекистан,
г. Ташкент, Республика Узбекистан*

Резюме. Исследовано влияние агонистов рецепторов пролиферации пероксисом на поведенческие и нейрохимические изменения при отмене алкоголя у крыс. Установлено, что введение на фоне интенсивной алкоголизации агонистов α -PPAR рецепторов, безафибрата и фенофибрата, смешанного агониста α , γ , β/δ -PPAR — метформина и агониста γ -PPAR рецепторов пиоглитазона снижают выраженность поведенческой симптоматики при синдроме отмены у крыс, нормализуя уровни некоторых нейромедиаторов в отделах головного мозга крыс.

Введение. Среди последствий злоупотребления алкоголем особое место занимает абстинентный синдром, развивающийся на фоне отмены потребления алкоголя и включающий в себя как физиологические нарушения, так и психопатологическую симптоматику [6]. Основным принципом лечения абстинентного синдрома является замещение алкоголя седативными препаратами, например, бензодиазепинами [14]. Они могут вызывать атаксию, дискоординацию, зависимость, при сочетании с алкоголем усиливают опьянение, угнетают дыхание, вплоть до коматозного состояния, иногда заканчивающегося летальным исходом [8]. Некоторыми авторами указывается, что в настоящее время в клинической практике отсутствуют приемлемые средства проведения дезинтоксикации у больных с алкогольной зависимостью и абстиненцией [7]. Накоплены экспериментальные данные о том, что агонисты рецепторов пролиферации пероксисом (PPAR) различных классов способны снижать уровни потребления и предпочтения алкоголя, однако нет данных об их влиянии на развитие алкогольного абстинентного синдрома.

Цель работы состояла в исследовании влияния агонистов α - и γ -PPAR рецепторов, а также агониста различных типов (α , γ , β/δ PPAR) рецепторов на поведенческие и нейрохимические изменения при моделировании синдрома отмены этанола у крыс.

Материалы и методы исследований. Для изучения влияния агонистов PPAR на выраженность синдрома отмены этанола проводили экспериментальное моделирование алкогольного абстинентного синдрома по методу Majchrowicz [12] в модификации Тезикова [2]. В эксперименте использовали крыс самцов линии *Wistar* с исходной массой 180–240 г. Животные содержались при смешанном освещении группами по 5 особей в каждой клетке, на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде и корму, в соответствии с СанПиН [3].

Все процедуры, связанные с уходом за животными, выполнялись в соответствии с методическими указаниями [4, 5].

Использовали интенсивную алкоголизацию и последующую отмену алкоголя, приводящую к развитию признаков абстиненции. Предварительно животные были разделены на 6 экспериментальных групп по 10 особей в каждой: 1 — контроль; 2 — СОЭ+Плацебо; 3 — СОЭ+Безафибрат; 4 — СОЭ+Фенофибрат; 5 — СОЭ+Пиоглитазон; 6 — СОЭ+Метформин. Животные соответствующих групп получали препараты с первого дня эксперимента: безафибрат, фенофибрат или метформин в дозах по 150 мг/кг в сутки в/ж, пиоглитазон в дозе 20 мг/кг в сутки в/ж. Группы «Контроль» и «СОЭ+Плацебо» получали эквивалентные количества воды.

Раствор этанола с содержанием 30 % (вес/объем) этанола, вводили внутривенно, 2 раза в день (в 9:00 и 19:00) в течение 7 суток. На протяжении первых суток раствор этанола вводили в фиксированной дозе 5,0 г/кг/раз, в последующие этанол вводили в максимально переносимых дозах, которые подбирались индивидуально для каждого животного: 6 г/кг — в случае отсутствия признаков интоксикации, сохранении высокой ригидности мышц спины; 5 г/кг — при снижении ригидности мышц спины и хвоста; 4 г/кг — при наличии слабовыраженной атаксии; 3 г/кг — при атаксии средней степени выраженности; 2 г/кг — при высокой степени атаксии; 1 г/кг — если животное не могло сохранить позу. В случае когда животное находилось в боковом положении, этанол не вводился. На восьмой день эксперимента, через 15 и 18 ч после последнего введения этанола, когда у животных наблюдаются наиболее выраженные симптомы отмены алкоголя, оценивали выраженность поведенческих признаков отмены. Для оценки выраженности признаков отмены в течение 1 мин у каждого животного визуально регистрировали наличие признаков мышечной ригидности (напряжение хвоста, пилоэреция, скандированность движений, катаlepsия, стереотипные движения), признаков мышечной гиперактивности (тремор хвоста, конечностей, головы, общий тремор, подергивание отдельных групп мышц, встряхивание головой и туловищем, пароксизмы стука зубами), признаков общей гиперактивности, (возбуждение, агрессивность, спонтанная вокализация, спонтанные и индуцированные судороги). При количественной оценке выраженности признаков реакции отмены использовали метод, предложенный Тезиковым [2]. Кроме того, оценивали признаки развития судорожного синдрома, индуцированного при предъявлении резкого звукового стимула (90 дБ) длительностью 60 с. Регистрировали развитие судорог и гибель животных, если таковая имела место.

По окончании эксперимента крыс эвтаназировали путем декапитации, выделяли головной мозг без перфузирования, препарировали отделы мозга и замораживали ткани в жидком азоте.

Для определения уровней нейроактивных аминокислот в тканях использовался хроматограф серии *Agilent* 1200 с 4-канальной системой подачи растворителя с вакуумным дегазатором, автосамплером, термостатом колонок и детектором флуоресценции. Определение уровней аминокислот проводили в хлорнокислых экстрактах, приготовленных на 0,2 М хлорной кислоте (1:10), содержащей 0,2 мМ норвалина в качестве внутреннего стандарта, по 50 мг/л ЭДТА и пиросульфата натрия в качестве антиоксидантов. Использовалась обращенно-фазная хроматография с предколоночной дериватизацией 0,4 % ортофталевым диальдегидом и 0,3 % 3-меркаптопропионовой кислотой в 0,4 М Na-боратном буфере pH 9,4 и де-

тектированием по флуоресценции (340/450 нм). Для разделения ОРА-производных свободных аминокислот использовали градиентное элюирование [1]. Обсчет хроматографических данных производился при помощи *Agilent ChemStation B 03.04* путем сравнения результатов анализа исследуемых хроматограмм со стандартной калибровочной кривой искусственной смеси аминокислот.

При проведении экспериментов руководствовались требованиями и методическими рекомендациями, принятыми в международной практике биомедицинских исследований. При работе с животными соблюдались этические нормы, установленные «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [9, 10].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения *GraphPad Prism v.8.0* и *Stat Soft STATISTICA 12.0*. Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Шапиро – Уилка. Для выявления статистической значимости отличий между экспериментальными группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA) и тест средневзвешенного Тьюки [13]. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$). Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое в выборочной совокупности, m — стандартная ошибка среднего значения.

Результаты исследования и их обсуждение. Показано, что введение на фоне алкоголизации на протяжении 7 суток агонистов α -PPAR рецепторов, безафibrата и фенофibrата, смешанного агониста $\alpha, \gamma, \beta/\delta$ -PPAR — метформина (по 150 мг/кг/сут, в/ж) и агониста γ -PPAR рецепторов пиоглиитазона (20 мг/кг/сут, в/ж) снижают выраженность поведенческой симптоматики синдрома отмены у крыс (табл. 1).

Установлено, что агонисты PPAR значимо снижали суммарное количество баллов, отражающих выраженность поведенческих признаков алкогольного абстинентного синдрома у крыс. Под влиянием безафibrата, фенофibrата, метформина и пиоглиитазона выраженность поведенческих признаков отмены этанола было значимо ниже, соответственно на 75,1, 81,9, 77,5 и 48,9 % по сравнению с группой получавшей плацебо. Также показано, что под влиянием препаратов агонистов PPAR менялась структура поведенческих признаков алкогольного абстинентного синдрома у крыс. В частности, фибраты и метформин у крыс в период 15 ч отмены этанола снижали уровень мышечной ригидности, в среднем на 45–55 %, и еще более выражено — уровни мышечной гиперактивности на 261,7, 240,0 и 325,0 % по сравнению с группой СОЭ+Плацебо, соответственно для безафibrата, фенофibrата и метформина (см. табл. 1).

В период 18 ч отмены этанола при индукции судорожного синдрома у крыс предъявлением им звукового стимула (90 дБ, 60 сек) во всех группах животных, получавших препараты, не отмечено гибели животных (табл. 2), тогда как в группе «СОЭ+Плацебо» гибель животных составила 30 %.

Нейробиологические механизмы судорожной готовности и поведенческих признаков гиперактивности при синдроме отмены алкоголя отражают дисбаланс в уровнях возбуждающих и тормозных нейромедиаторов и в основном опосредуются глутаматергической (прежде всего NMDA) системой [14]. При длительном употреблении алкоголя происходит снижение активности и экспрессии субъединиц ГАМК рецепторов с компенсаторным повышением числа NMDA-рецепторов в различных отделах мозга. Сдвиги в формировании пула нейро-

трансмиттерных аминокислот при длительной алкогольной интоксикации затрагивают все звенья их обмена: доступность и транспорт их предшественников, биосинтез, синаптический выброс и деградацию.

Таблица 1 — Выраженность и структура поведенческих признаков алкогольного абстинентного синдрома у крыс самцов линии Wistar после форсированной алкогольной интоксикации через 15 ч отмены при введении агонистов α -PPAR-рецепторов — безафибрата, фенофибрата в дозах 150 мг/кг в сутки, агониста γ PPAR-рецепторов, пиоглитазона, в дозе 20 мг/кг в сутки, и смешанного агониста α , γ , β/δ типов PPAR-рецепторов, метформина в дозе 150 мг/кг в сутки, баллов

№ п/п	Показатель	СОЭ + Плацебо	СОЭ + Безафибрат	СОЭ + Фенофибрат	СОЭ + Метформин	СОЭ + Пиоглитазон
1	Мышечная ригидность	220,0 ± 2,0	140,0 ± 1,6**	150,0 ± 1,7**	150,0 ± 1,7**	250,0 ± 1,7**
2	Мышечная гиперактивность	340,0 ± 9,5	94,0 ± 2,5**	100,0 ± 2,0**	80,0 ± 2,0**	80,0 ± 2,0**
3	Общая гиперактивность	95,0 ± 16,5	140,0 ± 12,0*	110,0 ± 10,0	139,0 ± 10,0*	110,0 ± 10,0
4	Суммарное количество баллов	655,0 ± 88,6	374,0 ± 48,8*	360,0 ± 49,0**	369,0 ± 54,2**	440,0 ± 67,6**

*, ** $p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно, по отношению к группе «СОЭ+Плацебо».

Таблица 2 — Гибель животных при индукции судорожных проявлений на пике алкогольного абстинентного синдрома у крыс самцов линии Wistar через 18 ч отмены, n = 10

№ п/п	Показатель	СОЭ + Плацебо	СОЭ + Безафибрат	СОЭ + Фенофибрат	СОЭ + Метформин	СОЭ + Пиоглитазон
1	Судороги	5	2	2	2	2
2	Гибель животных	3	0	0	0	0

В настоящем исследовании отмечено, что в период развития синдрома отмены этанола в изученных структурах мозга крыс повышались концентрации возбуждающих аминокислот, а тормозных, напротив, были снижены, что согласуется с литературными данными. Установлено, что фенофибрат и метформин снижают уровень глутамата в ткани больших полушарий головного мозга на 27,8 % и 31,4 % соответственно, по сравнению с алкоголизированными животными, не получавшими препараты. Пиоглитазон снижал уровень глутамата в ткани больших полушарий на 27,8 %, по сравнению с группой, не получавшей препаратов (табл. 3). Механизмы, лежащие в основе влияния агонистов PPAR-рецепторов на нейромедиаторные системы головного мозга, не установлены.

Таблица 3 — Влияние введения на фоне алкоголизации агонистов α -PPAR-рецепторов (фенофибрат, 150 мг/кг в сутки), γ PPAR-рецепторов (пиоглитазон, 20 мг/кг в сутки), и смешанного агониста α , γ , β/δ типов PPAR-рецепторов (метформин, 150 мг/кг в сутки) на содержание некоторых нейроактивных аминокислот в больших полушариях мозга крыс при отмене этанола (нмоль/г ткани)

Параметр	Контроль	СОЭ+ Плацебо	СОЭ+ Фенофибрат	СОЭ+ Метформин	СОЭ+ Пиоглитазон
Asp	2525,12 ± 60,12	2780,82 ± 50,78 ^a	2726,50 ± 80,16 ^a	2711,61 ± 50,78 ^a	2780,82 ± 50,78 ^a
Glu	8894,40 ± 345,11	9704,15 ± 435,20	7006,82 ± 621,15 ^b	6660,90 ± 602,12 ^b	9482,15 ± 248,14
Gly	879,15 ± 7,29	799,80 ± 20,31 ^a	768,11 ± 30,28 ^a	792,31 ± 20,94 ^a	787,15 ± 23,99 ^a
ГАМК	1668,20 ± 18,11	1501,12 ± 61,10 ^a	1531,12 ± 31,15 ^a	1566,24 ± 41,11 ^a	1541,12 ± 62,10 ^a

^a $p < 0,01$ — по сравнению с контролем; ^b $p < 0,01$ по сравнению с группой СОЭ+Плацебо.

Таким образом, установлено, что введение на фоне интенсивной алкоголизации на протяжении 7 суток агонистов α -PPAR рецепторов, безафибрата и фенофибрата, смешанного агониста α , γ , β/δ -PPAR — метформина (по 150 мг/кг/сут, в/ж) и агониста γ -PPAR рецепторов пиоглитазона (20 мг/кг/сут, в/ж) снижают выраженность поведенческой симптоматики синдрома отмены у крыс. Наблюдаемый эффект вероятно обусловлен нормализующим действием агонистов PPAR на уровни некоторых нейромедиаторов в отделах головного мозга крыс при синдроме отмены этанола.

Заключение. Полученные данные показывают, что агонисты рецепторов пролиферации пероксисом облегчают поведенческие и нейрохимические изменения при отмене алкоголя у крыс. В перспективе возможно их использование в качестве лекарственных средств в терапии алкогольного абстинентного синдрома. Механизмы, лежащие в основе влияния агонистов PPAR рецепторов на нейромедиаторные системы головного мозга, не изучены и требуют дальнейшего исследования.

Список литературы

1. Дорошенко, Е.М. Методика определения свободных аминокислот и их производных в тканях и биологических жидкостях человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е. М. Дорошенко, Л. И. Нефёдов, А. А. Глазев // МВИ. МН 806–98. Утв. БелГИМ. — 2008.
2. Значение толерантности к этанолу, тяжести синдрома отмены и возраста крыс в развитии посинтоксикационного алкогольного повреждения сердца / Е. Б. Тезиков [и др.] // Вопросы наркологии. — 1991. — № 1. — С. 7–9.
3. СанПиН 2.1.2.12–18–2006 Санитарные правила и нормы «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)». — Минск, 2007. — 40 с.
4. Технический кодекс установившейся практики Надлежащая лабораторная практика. Основные положения: ТКП 125–2008 (02040). — Минск, 2008. — 35 с.
5. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.: ил.
6. Alcohol withdrawal syndrome / M. Bayard [et al.] // J. Am. Fam. Physician. — 2004. — Vol. 69, № 6. — P. 1443–1450.
7. Bateman, D.N. Benzodiazepines / D.N. Bateman // J. Medicine. — 2003. — Vol. 31, № 10. — P. 36.
8. Benzodiazepine dependence: focus on withdrawal syndrome / N. Authier [et al.] // Ann. Pharm. Fr. — 2009. — Vol. 67, № 6. — P. 408–413.
9. ETS No.123. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Strasbourg, 1986. — 13 p.
10. ETS No.170. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Strasbourg, 1998. — 3 p.
11. Identification and management of alcohol withdrawal syndrome / A. Mirijello [et al.] // J. Drugs. — 2015. — Vol. 75, № 4. — P. 353–365.
12. Majchrowicz, E. Reversal in central nervous system function during ethanol withdrawal in humans and experimental animals / E. Majchrowicz // Fed. Proc. — 1981. — Vol. 40, № 7. — P. 2065–2072.
13. McHugh, M. L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA / M. L. McHugh // J. Biochemia Medica. — 2011. — Vol. 21, № 3. — P. 203–239.
14. Myrick, H. Clinical Management of Alcohol Withdrawal / H. Myrick, R. Anton // CNS Spectrums. — 2000. — Vol. 5, № 2. — P. 22–32.

EFFECT OF PEROXISOMAL PROLIFERATION RECEPTOR AGONISTS ON BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL ALTERATIONS DURING ALCOHOL WITHDRAWAL IN RATS

*Shlyahtun A.H., Raduta Ye.F., Sutsko I.P., Yankevich N.V.,
Bogdevich Ye.B., Marchik A.I., Semenenya I.N.*

*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*

Summary. *The effects of peroxisome proliferator-activated receptors agonists on the behavioral and neurochemical changes during alcohol withdrawal in rats were studied. It was established that the administration of α -PPAR receptor agonists, bezafibrate and fenofibrate, a mixed α , γ , β/δ -PPAR agonist metformin and γ -PPAR agonist of pioglitazone reduced the severity of ethanol withdrawal signs in rats, normalizing the levels of some neurotransmitters in the brain regions.*

Научное издание

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Выпуск 4

Сборник статей Международной научно-практической конференции,
посвященной 95-летию основателя Института биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси академика Ю. М. Островского

Ответственный за выпуск *Е. Ф. Радута*

Компьютерная верстка *Н. П. Засулевич*
Дизайн обложки *Н. П. Засулевич*
Корректоры *О. А. Соусь, В. А. Захарычева*

Подписано в печать 23.12.2020 г. Формат 60×84/8.
Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 30,00. Уч.-изд. л. 28,50.
Тираж 60 экз. Заказ. 502.

Республиканское унитарное предприятие
«Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».
Свидетельства о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.